

Entwicklung multivalenter Inhibitoren des Eintritts von Influenzaviren in Wirtszellen

Strukturelle Faktoren, die das antivirale Potential bestimmen

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biophysik

eingereicht an der

Lebenswissenschaftlichen Fakultät

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biologe (t.o.) Daniel Christian Lauster

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät Prof.

Dr. Bernhard Grimm

Gutachter: 1. Prof. Dr. Andreas Herrmann
 2. Prof. Dr. Rainer Haag
 3. Prof. Dr. Christian Hackenberger

Tag der mündlichen Prüfung: 25. Januar 2018

Das Wichtigste an jedem Gesetz ist nicht, was es sagt und beweist, sondern was ihm fehlt, um im Ernstfall zu stimmen. Im Gesetz der Entropie klafft eine winzige, aber nicht zu übersehende Lücke, und haargenau dort sitzt die Biologie und tut das Gegenteil dessen, was das Regelwerk dem Räderwerk vorschreibt.

(*1932, Walter Fürst)

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Daniel Lauster, dass die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel genutzt wurden. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet. Daten und Ergebnisse, die von anderen Wissenschaftlern im Rahmen von Kollaborationen erfasst wurden, sind mit einem Verweis auf den jeweiligen Wissenschaftler versehen. Kooperationspartner, die für die chemische Synthesen und Analysen der von mir untersuchten Substanzen zuständig waren, sind an entsprechender Stelle erwähnt.

Ich versichere außerdem, dass diese Dissertation nur in diesem und keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht wurde und, dass diesem Promotionsverfahren keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind.

Berlin, den 05. Dezember 2017

Daniel Lauster

Zusammenfassung

Das Influenza A Virus (IAV) stellt weltweit eine ernstzunehmende Bedrohung für Gesundheit und Wirtschaft der Menschheit dar. Ein universeller und langanhaltender Impfstoff konnte noch nicht entwickelt werden und klinisch zugelassene Medikamente verlieren durch die rasante Entstehung von resistenten Stämmen zunehmend ihre Wirkung. Aus diesem Grund gewinnt die Erforschung neuer antiviraler Strategien zur Bekämpfung des Influenzavirus an Bedeutung zum Schutze unserer Gesellschaft.

Eine vielversprechende Zielstruktur für die Entwicklung neuer antiviraler Medikamente stellt das virale Hämagglutinin (HA) dar. Das HA liegt in hoher Dichte auf Influenzaviren vor und ermöglicht die Bindung an Sialinsäuren (SA) auf Wirtszellen und die Verschmelzung mit deren Lipidmembran. HA-bindende Moleküle entfalten eine hemmende Wirkung bereits bei dem ersten Kontakt mit Zellen, sodass eine Infektion erst gar nicht stattfinden kann. Aufgrund einer hohen HA-Dichte auf der Virusoberfläche eignen sich besonders multivalente SA tragende Nanopartikel für die Hemmung einer viralen Infektion.

Aufbauend auf diesen Erkenntnissen, wurden in der vorliegenden Arbeit neue multivalente Binder gegenüber dem viralen Hämagglutinin (HA) entwickelt und studiert. Im Gegensatz zu bereits bekannten multivalenten Sialosiden, die in einer undefinierten räumlichen Orientierung auf Polymergerüsten präsentiert wurden, konnten in der vorliegenden Arbeit strukturelle Aspekte identifiziert werden, um Gerüstsysteme mit optimaler Rezeptorpräsentation gegenüber der Influenza A Virusoberfläche zu generieren. Für die Ermittlung einer optimalen, bivalenten Rezeptorpräsentation gegenüber HA wurden bivalente molekulare Lineale, basierend auf einem starren PNA-DNA-Heteroduplexgerüst und multivalenten funktionalisierten Q β -Phagenkapside verwendet. Als optimaler Abstand für eine Verbrückung von zwei oder drei SA-Bindetaschen wurde unter Zuhilfenahme von biochemischen Kompetitionsexperimenten und Affinitätsmessungen mit der mikroskaligen Thermophorese (MST) ein optimaler Abstand von 52 Å bestimmt. Durch eine multivalente Präsentation solcher bivalenten Cluster auf einer Poly-DNA und einer Feinjustierung der SA-Abstände auf dem Phagenkapsid konnten sehr effektive nanomolare Binder entwickelt werden. Darüber hinaus zeigte eine vergleichende Studie mit linearen und dendritischen Polyglycerolsialosiden, dass flexible Gerüstsysteme bei *in vitro*-Versuchen gegenüber starren Trägersystemen unterlegen sind, jedoch überzeugten flexible Gerüste deutlich in Tierexperimenten. Durch eine Modellierung experimenteller Daten konnten darüber hinaus wichtige Stellschrauben für die Entwicklung hoch affiner, multivalenter Sialosidsysteme bestimmt werden. Neben SA-basierten Polymersystemen wurde auch ein gegen HA gerichtetes Peptid aus einem Antikörper identifiziert, welches sich auch für eine multivalente Interaktion mit IAV eignet. Solch eine multivalente Peptidpräsentation erreichte ebenfalls nanomolare Inhibitionswerte und zeigte erfolgsversprechende Effekte im Tiermodell.

Zusammengefasst ermöglicht diese Arbeit neue Einblicke in die Auswahl geeigneter Trägersysteme, eines optimalen Rezeptorabstandes und der Verwendung alternativer Rezeptoren mit dem Ziel einer Infektionshemmung von IAV. Die gewonnenen Erkenntnisse unterstützen daher die Entwicklung von neuen multivalenten Virusbindern zur Bekämpfung von IAV.

Summary

Influenza A virus (IAV) still poses a serious threat to global health and economy of mankind. So far, a universal, long-lasting vaccine could not be developed, and clinically approved drugs are prone to lose activity due to the fast development of resistant strains. Because of this, research on new antiviral compounds and strategies to combat influenza viruses is of great importance for the protection of our society.

A promising candidate for the development of novel antiviral drugs is the viral hemagglutinin (HA) protein. HA is present at high density on the viral envelope, which allows binding to sialic acid (SA) molecules on host cells and fusion with their membrane. Following, HA binding molecules have an inhibitory effect at the very first step of the infection cycle, leading to the inability of an infection. Based on a high HA density on the viral surface, SA carrying nanoparticles qualify for the inhibition of a viral infection.

Based on this knowledge the study at hand demonstrates the development of new multivalent binders against viral HA and discusses them critically.

In contrast to published multivalent sialosides, which are displayed in an undefined fashion on polymer scaffolds, the results of this thesis support the identification of structural requirements for the design of new scaffold systems with an optimal match to the viral surface. Therefore, the sialic acid binding pockets of HA were scanned by implementation of bivalent, molecular rulers, based on a rigid DNA-PNA heteroduplex scaffold and multivalent, engineered Q β -phage capsids. Based on biochemical binding competition experiments and affinity measurements, using microscale thermophoresis (MST), 52 Å was determined as the optimal spacing to bridge two or three sialic acid binding pockets. Upon multivalent presentation of such bivalent clusters on poly-DNA, and by fine tuning the receptor arrangement on the phage capsid, highly effective nanomolar binders could be developed. Beyond, a comparative study with linear and dendritic polyglycerolsialosides revealed that flexible scaffold systems are inferior compared to rigid carrier systems in *in vitro* experiments. However, in animal experiments the flexible carrier systems exceeded the performance of rigid scaffolds. Upon modelling of experimental data, it was further possible to identify important adjustments for the development of highly affine, multivalent sialoside systems. Beside sialoside based polymer systems, completely new peptide based systems, based on an HA binding antibody, were developed. Similar to polyglycerolsialosides, such multivalent peptide-decorated polymers were able to achieve nanomolar binding inhibition constants, too. Further, animal experiments showed promising results.

In summary, this thesis enables new insights into the choice of a suitable carrier system, the optimal receptor spacing, and the use of alternative receptors with the ultimate goal of virus neutralization. Thus, gained findings support the development of novel, multivalent virus antivirals.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen fremdsprachiger Begriffe, die nicht mit den Abkürzungen entsprechender deutscher Begriffen übereinstimmen, jedoch üblicherweise in der deutschen Fachsprache Verwendung finden, wurden in der gegenwärtigen Arbeit zur Vereinfachung übernommen. Fremdsprachige Begriffe sind kursiv dargestellt und deren Übersetzung ins Deutsche wurde in Klammern geschrieben.

% Prozent

°C Grad Celsius

A

APS Ammoniumperoxidsulfat

ATCC *American Type Culture Collection* (Amerikanische Zellkultursammlung)

B

b Hill-Koeffizient

BCA *Bicinchoninic acid* (Bicinchoninin-Säure)

bHA Bromelain verdautes Hämagglutinin

BSA *Bovine serum album* (Rinderserumalbumin)

bspw. beispielsweise

bzw. beziehungsweise

C

ca. circa

cDNA *circular Deoxyribonucleic acid* (zirkuläre Desoxyribonukleinsäure)

CDR *Complementarity-determining region* (Komplementaritätsbestimmende Region)

D

Da Dalton

DAPI 4',6-Diamidin-2-phenylindol

DMEM Dulbecco's minimales essentielles Medium

DMSO Dimethylsulfoxid

DNA *Deoxyribonucleic acid* (Desoxyribonukleinsäure)

dNTP deoxyribonucleosidtriphosphate

DPBS *Dulbecco's phosphate buffered saline* (Dulbeccos Phosphat gepufferte Saline)

DRK Deutsches Rotes Kreuz

DTT Dithiothreitol

E

EB *Entry blocker* (Zugangsblockierer)

EDTA *Ethylendiamintetraacetat* (Ethylendiamintetraessigsäure)

EDC 1-Ethyl-(3-dimethylaminopropylcarbodiimid)

EM Elektronenmikroskopie

et al. *Et alii* (und andere)

F

FACS *Fluorescent-activated cell sorting* (Durchflusszytometrie)

FBS	<i>Fetal bovine serum</i> (Fötales Kälberserum)
FCS	<i>Fluorescence correlation spectroscopy</i> (Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie)
FDQ	<i>Fluorescence dequenching quotient</i> (Fluoreszenzselbstlöschungsquotient)
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i> (Fibroblasten-Wachstumsfaktor)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
FU	Freie Universität Berlin
G	
G	Gravitation
H	
h	<i>Hour</i> (Stunde)
HA	Hämagglutinin
HAU	<i>Hemagglutination unit</i> (Hämagglutinationseinheit)
HBSP	<i>Hepes-buffered saline polysorbate</i> (Hepes-gepuffertes Saline-Polysorbat)
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HRP	<i>Horse radish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
HU	Humboldt-Universität zu Berlin
I	
IAV	Influenza A Virus
IgG	Immunglobulin G
K	
kb	Kilobase
k_{cat}	Katalytische Konstante
K_{M}	Michaelis-Menten-Konstante
L	
l	Liter
LED	Licht-emittierende Diode
log	Logarithmus
LP	<i>Low pathogenic</i> (gering pathogen)
M	
M	Molar (g/mol)
M1	Matrixprotein-1
m	Meter
mRNA	<i>Messenger RNA</i> (Boten-RNA)
MALDI	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionisation</i> (Matrix-unterstützte Laserdesorption/-ionisation)
min	Minute
Mio.	Millionen
MOI	<i>Multiplicity of infection</i> (Multiplizität der Infektion)
MS	Massenspektroskopie
MST	Mikroskalige Thermophorese
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazoliumsalz

MW	<i>Molecular weight</i> (Molekulargewicht)
N	
N.A.	Numerische Apertur
NEP	Nukleares Exportprotein
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NP	Nanopartikel
NP ^{IAV}	Nukleoprotein von Influenza A Viren
NS1	Nichtstrukturprotein-1
O	
OPD	σ -Phenylendiamindihydrochlorid
P	
PA	<i>Polymerase acid protein</i> (Polymerase saures Protein)
PB1, PB2	Polymerase basisches Protein-1, Polymerase basisches Protein-2
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PDB	<i>Protein Data Bank</i> (Proteindatenbank)
PeA	Peptid A
PeB	Peptid B
PeC	Peptid C
PFA	Paraformaldehyd
pfu	<i>plaque forming unit</i> (Plaques bildende Einheit)
PG	Polyglycerol
PGSA	Polyglycerolsialoside
pH	Negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PNA	<i>Peptide nucleic acid</i> (Peptidische Nukleinsäure)
pol	Polymerase
p.i.	<i>Post infection</i> (nach Infektion)
R	
R18	Octadecyl Rhodamine B Chlorid
RdRP	<i>RNA-dependent RNA polymerase</i> (RNA-abhängige RNA-Polymerase)
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RP-18	<i>Reverse Phase C₁₈</i> (Umkehrphase C ₁₈)
RT	Raumtemperatur
RU	<i>Response Units</i> (Signal-Einheiten)
S	
S	Summe der Fehlerquadrate
s	Sekunde
ss	<i>Single-stranded</i> (Einzelsträngig)
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfat</i> (Natriumdodecylsulfat)
SE	<i>Standard error</i> (Standardfehler)
SEM	<i>Standard error of the mean</i> (Standardfehler des Mittelwertes)
SELEX	<i>Systematic evolution of ligands by exponential enrichment</i> (Systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung)

SI	<i>Système international d'unités</i> (Internationales Einheitensystem)
T	
TCID ₅₀	<i>Tissue culture infectious dose 50</i> (Zellkultur infektiöse Dosis von 50 %)
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TLR	<i>Toll-like receptor</i> (Toll-ähnlicher Rezeptor)
TPCK	L-(tosylamido-2-phenyl)ethylchloromethylketon
U	
U	<i>Unit</i> (Einheit)
UTR	<i>Untranslated region</i> (Untranslatierter Bereich)
UV	Ultraviolett
V	
v	Volumen
vRNP	virales Ribonukleoprotein
W	
w	<i>Weight</i> (Gewicht)
WSN	Wilson Smith neurotropisch
X	
x	Gekreuzt mit

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung	I
Zusammenfassung.....	II
Summary	III
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
Inhaltsverzeichnis.....	VIII
Einheiten	XI
1. Einleitung.....	1
1.1 Influenza A Viren.....	1
1.1.1 Nomenklatur	1
1.1.2 Pathomechanismen	1
1.1.3 Epidemiologie.....	3
1.1.4 Virusstruktur	5
1.1.5 Replikationszyklus.....	9
1.2 Infektionshemmung von Influenza A Viren.....	11
1.2.1 Antivirale Strategien	11
1.2.2 Hämagglutinin als antivirale Zielstruktur	13
1.3 Multivalenz	14
1.3.1 Prinzipien der Multivalenz.....	14
1.3.2 Multivalente Inhibitoren gegen das Influenzavirus.....	17
1.3.3 Methoden und Techniken für molekulare Interaktionsstudien	19
1.3.4 Mikroskalige Thermophorese	22
2. Ziele dieser Studie	25
3. Materialien und Methoden.....	27
3.1 Materialien	27
3.1.1 Laborgeräte.....	27
3.1.2 Labormaterialien.....	28
3.1.3 Chemikalien, Lösungen und biologisches Material	28
3.1.4 Arbeit mit Oligonukleotid Aptameren	31
3.1.5 Arbeit mit Peptiden.....	32
3.1.6 Arbeit mit Kohlenhydraten	33
3.2 Methoden.....	34
3.2.1 Arbeit mit Labortieren	34
3.2.2 Kultivierung von Zellen.....	34
3.2.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen	34

3.2.4 Zählen von Zellen	35
3.2.5 Arbeit mit Viren.....	35
3.2.6 Viruszucht und Lagerung.....	35
3.2.7 Virustitration.....	36
3.2.8 Aufreinigung von Influenzaviren.....	37
3.2.9 Proteinquantifizierung	37
3.2.10 Aufreinigung und Fluoreszenzmarkierung von Influenza Hämagglutinin.....	38
3.2.11 Hämagglutinationsinhibition	39
3.2.12 Quantifizierung von Einzelzellbindung mittels Durchflusszytometrie	39
3.2.13 Fusionsinhibitionstests.....	40
3.2.14 Mikroskopie.....	42
3.2.15 Immunodetektion und Quantifizierung von Influenza Nukleoproteinsignal.....	43
3.2.16 Mikroneutralisationstest.....	44
3.2.17 Zellviabilitätstest.....	44
3.2.18 Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie gestützte Bindungsmessungen	45
3.2.19 Affinitätsmessungen mittels mikroskaliger Thermophorese.....	47
3.2.20 Infektionsinhibition im <i>in vivo</i> Mausmodell	49
4. Ergebnisse	51
4.1 Monovalente IAV-Inhibitoren.....	52
4.1.1 Antivirale Peptide aus einem HA bindenden Antikörper	53
4.1.2 Untersuchung des Bindungsinhibitionspotentials ausgewählter, monovalenter IAV-Binder ...	56
4.1.3 Untersuchung viraler Fusionsinhibition mit monovalenten HA-Bindern	62
4.1.4 Hemmung von IAV-Infektion mit Antikörperpeptiden	65
4.2 Untersuchung der Bindungskinetik von IAV an multivalenten Oberflächen.....	67
4.3 Statistische Rezeptor-Polyglycerolkonjugate als IAV-Inhibitoren	69
4.3.1 Rolle der Rezeptordichte und Gerüstmorphologie bei der Inhibition von IAV am Beispiel von Polyglycerolsialosiden	69
4.3.2 Multivalente Präsentation von Peptiden auf dendritischen Polyglycerolen	83
4.4 Definierte Rezeptor-Polymerkonjugate als IAV-Inhibitoren	89
4.4.1 Bestimmung des Rezeptorabstandes mit PNA-DNA basierten molekularen Linealen für eine optimale Bindung an HA	89
4.4.2 Bestimmung einer Abstands-Affinitätsbeziehung mit PeB-PNA-Konjugaten	96
4.4.3 Multivalente Präsentation von Sialosiden auf Q β -Phagenkapsiden zur Hemmung von IAV ...	98
4.5 Die Rolle viraler Morphologie bei der Zellbindung.....	105
5. Diskussion	109
5.1 Einschränkungen bei der Methodenwahl zur Ermittlung der Bindungsinhibition schwach affiner Binder	110

5.2 Identifizierung alternativer HA-Rezeptoren	111
5.3 Aus Antikörpern abgeleitete Peptide gegen IAV	113
5.4 Wirkmechanismen der Peptide Mucroporin-M1 und EB	114
5.5 Eignung alternativer HA-Binder für eine multivalente Interaktion mit IAV	115
5.6 Die Rolle der Größe und Morphologie von PGSA bei der Inhibition von IAV	116
5.7 Betrachtung des Bindungsmodus von linearen Polyglycerolsialosiden	120
5.8 Multivalente PG-Peptidkonjugate als attraktive Alternative zu multivalenten Sialosiden	122
5.9 Eignung von molekularen Werkzeugen zur Ermittlung einer optimalen, bivalenten Bindung an IAV	124
5.10 Das Q β -Phagenkapsidgerüst als IAV-Inhibitor und Modell für Multivalenzstudien	128
5.11 Wahl der Gerüstgeometrie bei der Inhibition filamentöser IAV	130
6. Schlussfolgerung und Ausblick	131
Weiterführende Informationen	133
Danksagung	142
Literaturverzeichnis	143

Einheiten

Wenn möglich wurden Einheiten und Präfixe des internationalen Einheitssystems (SI) verwendet. Die folgenden Einheiten sind davon ausgenommen:

Pfu	<i>Plaque forming unit</i> (Plaques bildende Einheit)
MOI	<i>Multiplicity of infection</i> (Vielfaches der Infektion)
TCID ₅₀	<i>Tissue culture infectious dose 50</i> (Zellkultur infektiöse Dosis von 50 %)
RU	<i>Response unit</i> (Signaleinheit)
U	<i>Unit</i> (Einheit)
°C	Grad Celsius
%	Prozent

1. Einleitung

1.1 Influenza A Viren

Influenzaviren besitzen ein segmentiertes, einzelsträngiges Ribonukleinsäure (ssRNA) Genom mit negativer Polarität und gehören zur Familie der *Orthomyxoviridae* (Influenzaviren A, B, C, D, Thogotoviren, Isaviren). Influenza A Viren (IAV) besitzen acht Genomsegmente, wohingegen Influenza C und D sieben und Thogotoviren sechs Segmente aufweisen ([Howley and Knipe 2007](#), [Hause, Ducatez et al. 2013](#), [Ferguson, Olivier et al. 2016](#)).

Influenza A Viren (IAV) sind weltweit verbreitet und führen beim Menschen zu einer akuten Atemwegsinfektion, wodurch eine Virusgrippe („Influenza“) ausgelöst werden kann. Jedes Jahr sind drei bis fünf Millionen Menschen von einer Infektion mit saisonalen Influenzaviren betroffen und erliegen einer Virusgrippe. Im Durchschnitt kommen dabei 250.000 bis 500.000 Menschen zu Tode ([Hussain, Galvin et al. 2017](#)).

1.1.1 Nomenklatur

IAV werden bezüglich ihrer Oberflächenproteine Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA) in mehrere Subtypen bzw. Serotypen unterteilt. Für die Beschreibung des Serotyps werden IAV mit der Kodierung HxNy (x = 1-18, y = 1-11) klassifiziert. Zur genaueren Benennung verschiedener Virusisolate desselben Serotyps führte die Weltgesundheitsorganisation (WHO) folgende Nomenklatur ein: Virustyp/Ursprungswirt (falls nicht human) /Isolationsort /Stammnummer/Isolationsjahr (HA-/NA-Serotyp) (z.B. A/mallard/Germany/439/2004 (H3N2), B/Thüringen/02/2006). Der Serotyp wird nur für die Bezeichnung von IAV-Stämmen verwendet. Zur Vereinfachung sind die Influenzastämme im folgenden Teil der Arbeit ohne Stammnummer und Isolationsjahr dargestellt (z.B. A/mallard/Germany (H3N2) und B/Thüringen).

1.1.2 Pathomechanismen

IAV können durch Einatmung von Aerosolen oder über Schmierinfektion auf den Menschen übertragen werden, wo sie bevorzugt an respiratorisches Epithel binden und eine Infektion auslösen können. Dabei verursachen IAV beim Menschen verschiedene Krankheitsformen: Am häufigsten ist der obere respiratorische Trakt betroffen, woraus akute respiratorische Erkrankungen bis hin zu lebensbedrohlichen Pneumonien resultieren können. Symptomatisch äußert sich dies durch ein plötzliches Aufkommen von hohem Fieber, sowie Husten, Kopfschmerzen, Abgeschlagenheit, Schnupfen, Appetitlosigkeit und Entzündung der oberen Atemwege ([Taubenberger and Morens 2008](#)). Diese akute Symptomatik dauert in der Regel bis zu 10 Tage. Durch eine systemische Ausbreitung von neurotrophen IAV-Stämmen kann es auch zu einer

Enzephalitis oder neurologischen Erkrankungen kommen ([Ludlow, Kortekaas et al. 2016](#)). Darüber hinaus kann eine Schmierinfektion eine Konjunktivitis verursachen ([Taubenberger and Morens 2008](#)).

Die virusbedingte Pathogenese ist hierbei abhängig vom Virusstamm, wodurch Wirts-, Gewebs- und Zelltropismus determiniert sind. Nach aktueller Auffassung ist der Wirtstropismus von IAV vorwiegend über den Serotyp, also der Kombination aus dem HA- und NA-Typ determiniert, welche für die Erkennung und Zerstörung von Sialinsäurerezeptoren benötigt werden ([Pekosz, Newby et al. 2009](#), [Böttcher-Friebertshauser, Garten et al. 2014](#)). Jedoch sind auch andere IAV-Proteine (z.B. Polymerase basisches Protein-2 (PB2) und Nichtstrukturprotein-1 (NS1)) oder wirtsabhängige Faktoren (z.B. Temperatur, Immunkompetenz, Genotyp) für den Wirtstropismus verantwortlich ([Dankar, Wang et al. 2011](#), [Hrincius, Hennecke et al. 2012](#), [Zeng, Goldsmith et al. 2013](#), [Kuo, Chen et al. 2017](#)).

Bei Menschen, die von einer Infektion mit saisonalen Virusstämmen betroffen waren, zeigte sich eine deutliche pathologische Gewebsveränderung der oberen Atemwege, wohingegen zoonotische Viren beim Menschen den unteren respiratorischen Trakt befallen ([Kuiken, Riteau et al. 2012](#)). Für Infektionen durch das pandemische A/H1N1pdm09 Virus hingegen zeigte sich eine unspezifische Gewebspathologie verschiedener Lungenareale ([Childs, Palma et al. 2009](#)). Da der Großteil des adulten humanen Respirationstraktes α -2,6-Sialoside exprimiert ([Baum and Paulson 1990](#)), ist eine Infektion durch die humanpathogenen IAV-Stämme des Typs H1-3 begünstigt (siehe Abschnitt 1.1.4). Jedoch zeigten weitere Studien, dass α -2,3-Sialoside gehäuft bei Kindern und im unteren respiratorischen Trakt von Adulten exprimiert werden, was die Anfälligkeit gegenüber aviärpathogenen IAV-Stämmen erklären könnte ([Shinya, Ebina et al. 2006](#), [Nicholls, Bourne et al. 2007](#), [Kuiken, Riteau et al. 2012](#)). IAV können an verschiedene SA-präsentierende Zellen binden und diese folglich infizieren. Jedoch zeigten Weinheimer und Mitarbeiter in einer Studie mit einem *ex vivo* Lungenmodell, dass aviäre und saisonale Influenzaviren bevorzugt in Typ-2 Pneumozyten von Alveolen replizieren ([Weinheimer, Becher et al. 2012](#)). Die Forschergruppe konnte weiterhin zeigen, dass eine IAV-bedingte Lungeninfektion weniger über den Zelltropismus determiniert ist, sondern vielmehr über die Replikationseffizienz in Typ-2 Pneumozyten und der Fähigkeit eine Immunantwort in Schach zu halten.

Der menschliche Wirt reagiert auf eine Infektion mit Influenzaviren mit einer angeborenen und einer erworbenen Immunantwort. Während Infektionen mit saisonalen Grippeviren eine milde Immunreaktion auslösen, können zoonotische Viren (z.B. H5N1, H7N9, H10N8) heftige Immunreaktionen verursachen, welche häufig zum Tod führen ([Fukuyama and Kawaoka 2011](#), [Liu, Zhou et al. 2016](#)). Besonders die enorme Ausschüttung von Zytokinen (engl. *cytokine*

storm) nach einer Infektion mit zoonotischen IAV führt zu einer massiven Entzündungsreaktion und wird nach aktueller Auffassung als Ursache für die hohe Mortalitätsrate angesehen ([Liu, Zhou et al. 2016](#)). Begleitend zu einer IAV-Infektion wurde bei Menschen mit schwachem Immunsystem auch bakterielle Superinfektionen beobachtet, welche den Verlauf der Infektion dramatisch verschlimmern können ([Taubenberger and Morens 2008](#), [Rynda-Apple, Robinson et al. 2015](#)). Diese Begleiterscheinungen einer IAV-Infektion stellen daher auch eine Herausforderung bei der Erhebung eines pathologischen Befunds *post mortem* dar, da der virusverursachte Anteil an histologischen Veränderungen nicht eindeutig von anderen infektionsassoziierten Faktoren abgegrenzt werden kann. Jedoch können zwischen Individuen, die von saisonalen Grippeviren und solchen, die von pandemischen oder zoonotischen Viren befallen waren, histologische Unterschiede ausgemacht werden.

Individuen, die von der saisonalen Grippe betroffen waren, zeigten eher oberflächliche Nekrosen des Lungenepithels im oberen Respirationstrakt und eine Infiltration von Lymphozyten und Alveolarmakrophagen in die Lamina propria auf ([Kuiken, Riteau et al. 2012](#)). Hingegen zeigten histologische Befunde aus dem Jahre 1918 von Personen, die an der spanischen Grippe (H1N1) verstorben waren, häufig eine multifokale, nekrotische Zerstörung und Ablösung des mehrreihigen Lungenepithels in der Trachea und in den Bronchien ([Taubenberger and Morens 2008](#)). Außerdem wurde eine Ödembildung und Stauchung der Submukosa beschrieben. Erst nach dem Untergang von Epithelzellen kann es zu einer massiven Einblutung und Neutrophileninfiltration kommen. In Patienten, die an einer Infektion mit dem hochpathogenen H5N1 Influenzavirus verstorben waren, konnten massive Lungengewebsschäden, Einblutungen und Immunezellinfiltrate bedingt durch eine Überreaktion des Immunsystems nachgewiesen werden ([de Jong, Simmons et al. 2006](#)).

1.1.3 Epidemiologie

Die Influenzaviren der Gattung A, B, C und D sind epidemiologisch sehr verschieden: Zu IAV sind zahlreiche Epidemien und seit dem Mittelalter ca. ein Duzend Pandemien mit verheerenden Auswirkungen beschrieben worden ([Taubenberger and Morens 2008](#)). Influenza B Viren hingegen führten bisher nur zu Epidemien mit milderem Ausmaß. Influenza C gilt als ein endemisches Virus, über welches nur vereinzelt Infektionen beim Menschen beschrieben worden sind ([Taubenberger and Morens 2008](#)). Das erst kürzlich entdeckte Influenza D Virus konnte bisher nur in Schweinen, Rindern und Schafen nachgewiesen werden ([Su, Fu et al. 2017](#)).

Zu den häufigsten Wirten von IAV zählen aquatische Vögel, wie diverse Entengattungen, die die Viren an andere Tiere, wie im oder am Wasser lebende Vertebraten (häufig Meeressäuger oder Seelöwen) und am Land lebende, domestizierte Säugetiere (insbesondere Schweine, Hüh-

ner und Pferde) übertragen können ([Webster, Bean et al. 1992](#)). Da sich H1-16 sowie N1-9 in Vögeln nachweisen ließen, wurde der Vogel als natürlicher Wirt und primärer Vektor von IAV identifiziert ([Webster, Bean et al. 1992](#)). Das Virus kann direkt oder nach mehreren Zirkulationen innerhalb der Tiere auf den Menschen übertragen werden. Damit besitzen IAV die Fähigkeit, Artgrenzen zu überschreiten (Zoonose). Beim Menschen können diese Viren eine Grippe mit ernsthaftem Krankheitsverlauf auslösen (siehe Abschnitt 1.1.2).

Bei den humanpathogenen Viren unterscheidet man zwischen saisonalen Grippeviren, die innerhalb der Menschenpopulation zirkulieren, pandemischen Influenzaviren, die durch genetische Rekombination (Antigenshift) zwischen human- und aviärpathogenen Influenzastämmen entstehen und zoonotischen Influenzaviren ([Bui, Chughtai et al. 2017](#)), die nicht an den Menschen als Wirt adaptiert sind, jedoch schwerwiegende Infektionen auslösen können. Pandemische Viren hingegen kommen weit seltener und unregelmäßiger vor, forderten jedoch in kurzer Zeit viele Menschenleben. Ältere Menschen oder Kinder sind aufgrund eines schwachen Immunsystems am häufigsten betroffen.

Im letzten Jahrhundert sind vier Fälle einer durch Influenza A Viren ausgelösten Pandemie beschrieben worden: Die Spanischen Grippe (H1N1) im Jahr 1918/19 führte zu ~50 Millionen Todesfällen ([Taubenberger and Morens 2006](#)), an der Asiatischen Grippe (H2N2) im Jahr 1957 verstarben ca. 70.000 Menschen, die Hongkong-Grippe (H3N2) im Jahr 1968 kostete ca. 1 Mio. Menschen das Leben und die mexikanische Grippe (H1N1)pdm09 forderte 2009 ca. 575.000 Menschenleben ([Saunders-Hastings and Krewski 2016](#)).

Wie rasant und effektiv sich Influenzaviren über Tröpfcheninfektion ausbreiten können, zeigt ein Bericht aus dem Jahr 1977 über einen Influenzaausbruch an Bord eines defekten Flugzeugs. Bei diesem Vorfall waren ausgehend von einem mit Influenzaviren infizierten Passagier 72 % der 54 Bordgäste innerhalb von 3 h mit demselben Virusstamm infiziert ([Moser, Bender et al. 1979](#)). Die zunehmende Urbanisierung und Globalisierung begünstigen weiter eine schnelle, weltweite Verbreitung von neu entstandenen, pandemischen IAV-Stämmen, die aus einem Antigenshift hervorgegangen sind ([Glezen 1996](#)).

Als Ursache von Pandemien wird das enge Zusammenleben von Mensch und Tier besonders im asiatischen Raum vermutet. Zoonotische Viren können so leichter auf den Menschen übertragen werden. Obwohl zoonotische Influenzaviren über einen eingeschränkten Tropismus verfügen, können Stämme mancher Serotypen, wie beispielsweise H5N1 oder H7N9, beachtlich hohe Mortalitätsraten (40-50 %) hervorrufen ([de Graaf and Fouchier 2014](#), [Bui, Chughtai et al. 2017](#)). Studien an H5N1 Viren zeigten auch, dass nur eine einzelne Aminosäuremutation in der SA-Bindetasche von HA (Antigendrift) genügen würde, um eine Transmission zwischen Frettchen zu ermöglichen ([Xiong, Coombs et al. 2013](#)).

Aufgrund dieser massiven Bedrohung berief die seit 1948 bestehende Weltgesundheitsorganisation (WHO) im Jahre 1952 die Sonderkommission GISRS (engl. *Global Influenza Surveillance and Response System*) zur weltweiten Überwachung von Influenzafällen und -typisierung ein. Damit soll ein Gefahrenpotential durch Influenzaviren frühzeitig erkannt werden, um im Ernstfall mit Präventivmaßnahmen eine weitere Virusausbreitung eindämmen zu können ([Saunders-Hastings and Krewski 2016](#)). Das FluNet sammelt Informationen aus verschiedenen Laboren weltweit und stellt sie öffentlich im Internet zur Verfügung. Aufgrund der zunehmenden Entwicklung von Resistenzen gegenüber zugelassenen Medikamenten ([Hussain, Galvin et al. 2017](#)) werden isolierte Stämme auch auf Mutationen und Resistenzen gegenüber diesen Medikamenten untersucht.

1.1.4 Virusstruktur

Influenzaviren sind umhüllte Viren, die auf ihrer Membran charakteristische, stachelartige (engl. *spike*) Glykoproteine in hoher Dichte aufweisen ([Harris, Cardone et al. 2006](#)). Influenzaviruspartikel weisen eine pleomorphe Struktur auf ([Harris, Cardone et al. 2006](#)). Die eher sphärischen Partikel haben einen Durchmesser von ca. 100 nm, während filamentöse Viren durchaus eine Länge von bis zu 300 nm aufweisen können ([Badham and Rossman 2016](#), [Dadonaite, Vijayakrishnan et al. 2016](#)).

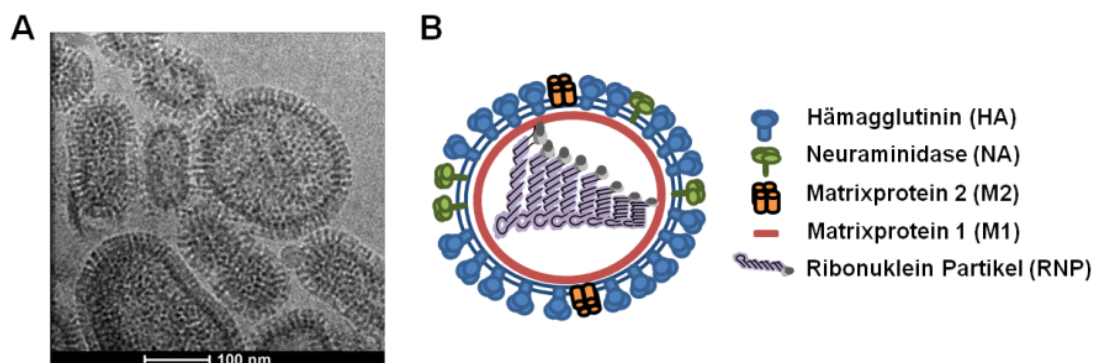


Abbildung 1: Struktur von Influenza A Viren. A) Kryo-EM-Aufnahme von Influenza A/X31 (H3N2) Viruspartikeln. Das Bild wurde freundlicherweise von Dr. Kai Ludwig (FU Berlin) zur Verfügung gestellt. B) Schematische Darstellung des Aufbaus eines Influenza A Virus. Die Glykoproteine HA und NA, sowie das Matrixprotein-2 (M2) sind in der viralen Lipidmembran (blaue Kreise) verankert. Unterhalb der Lipidschicht befindet sich das Matrixprotein-1 (M1) Kapsid (roter Kreis) und im Viruslumen acht virale Ribonukleoproteine (vRNP).

Das Influenza A Virus besitzt eine dichtgepackte Glykoproteinkorona, die aus den Glykoproteinen HA (ca. 76 kDa) und NA (ca. 56 kDa) zusammengesetzt ist (Abbildung 1) ([Harris, Cardone et al. 2006](#)). Bisher sind 18 HA und 11 NA Serotypen in der Literatur beschrieben worden ([de Graaf and Fouchier 2014](#)). HA-Varianten des Typs H1-H3 sind an den menschlichen Wirt adaptiert ([Yoon, Webby et al. 2014](#)), während H4-H16 vorwiegend Vögel infizieren. Die HA-Varianten H17 und H18 wurden bisher nur in Fledermäusen nachgewiesen ([Mehle 2014](#)).

Im Folgenden werden die einzelnen Virusmembranproteine in ihrer Funktion beschrieben:

Hämagglutinin (HA) ist ein homotrimeres Typ-1 Transmembranprotein und besitzt je Monomer eine Bindetasche für den Sialyllactosamin-(SLA)-Rezeptor (0,02-0,04 SLA-Bindetaschen pro nm² Virusoberfläche) (Abbildung 2 A). Der SLA-Rezeptor wird in hoher Zahl (0,5-2 SLA pro nm² der Wirtszelle) über Glykoproteine und -lipide auf Wirtszellen präsentiert ([Eisen, Sabesan et al. 1997](#), [Mammen, Choi et al. 1998](#)). Die HA-Varianten H1-16 binden an Oligosaccharide mit einer terminaler Sialinsäuregruppe ([Rogers and Paulson 1983](#)). Für die Varianten H17 und H18 konnte bisher keine Bindung an Sialoside nachgewiesen werden und der natürliche Rezeptor ist noch unbekannt ([Mehle 2014](#)). Bei der Rezeptorbindung von HA ist hervorzuheben, dass humanpathogene Viren bevorzugt Sialoside mit α -2,6 glykosidischer Verknüpfung binden ([Gambaryan, Tuzikov et al. 1997](#), [Matrosovich, Tuzikov et al. 2000](#)), während aviärpathogene Viren an α -2,3 verknüpfte Sialoside binden ([Rogers and Paulson 1983](#), [Nobusawa, Aoyama et al. 1991](#)).

Der ektovirale Teil des HA-Trimers ist ca. 13 nm lang und hat in der Aufsicht einen Durchmesser von ca. 5 nm. Des Weiteren ist jedes HA-Monomer in zwei Domänen unterteilt: eine globuläre Kopfdomäne (HA1), die die SLA-Bindetasche an der Oberseite des Proteins trägt, und eine zylindrischen Fusionsdomäne (HA2), die eine Membranfusion zwischen Virus- und Wirtszellmembran ermöglicht (Abbildung 2 A)([Skehel and Wiley 2000](#)). Die beiden HA-Domänen gehen aus einer naszierenden Polypeptidsequenz (HA0) hervor, die über posttranslationale Prozessierung von Wirtszellproteasen zu HA1 und HA2 gespalten werden. Die beiden Ketten sind kovalent über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden ([Howley and Knipe 2007](#)). Weitere posttranslationale Modifikationen beinhalten N-Glykosylierungen der HA-Ektodomäne und Acetylierungen des zytosolischen HA-Abschnitts ([Veit, Serebryakova et al. 2013](#), [Tate, Job et al. 2014](#)). Die Glykosylierung von HA erwies sich als essentiell für Proteinreifung und Einbau in die Virushülle ([Roberts, Garten et al. 1993](#)). Aufgrund der Variation in der Häufigkeit und Position von Glykosylierungsstellen wird ihnen auch eine Schutzfunktion vor Immunfaktoren zugeschrieben ([Tate, Job et al. 2014](#)). Für posttranslationale Modifikationen am zytosolischen Teil von HA wurde eine Relevanz für die Assemblierung der viralen Bestandteile und ihrer Funktion bei der Lokalisierung in Lipiddomänen (engl. *lipid rafts*) der Wirtszellmembran beobachtet ([Veit, Serebryakova et al. 2013](#)). Anhand der Kristallstruktur der HA-Ektodomäne (PDB: 2VUI) im Komplex mit seinem Rezeptor lässt sich ein intratrimerischer, mittlerer Abstand von 46 Å zwischen den Bindetaschen für Sialinsäure (SA) abmessen ([Choi 2004](#)). Über den durchschnittlichen Abstand der HA-Mittelpunkte zueinander (105 Å), der mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) an A/X31 (H3N2) Viren ermittelt wurde, lässt sich ein intertrimerer Abstand von 59 Å zwischen zwei aneinandergrenzenden SA-Bindetaschen ermitteln (Abbildung 2 B)([Harris, Cardone et al. 2006](#)). Bei den Abstandsbestimmungen wur-

den jedoch topologische Unebenheiten, die zu einer sterischen Unzugänglichkeit führen (Abbildung 2A), nicht berücksichtigt. Gleiches gilt für das Vorliegen einer weiteren potentiellen Sialinsäurebindestelle am HA, die erstmals von Sauter und Kollegen beschrieben wurde und die, wie sich im Verlauf dieser Arbeit zeigt, eine Rolle bei der Bindung von verknüpften SA-Rezeptoren spielen könnte ([Sauter, Glick et al. 1992](#)).

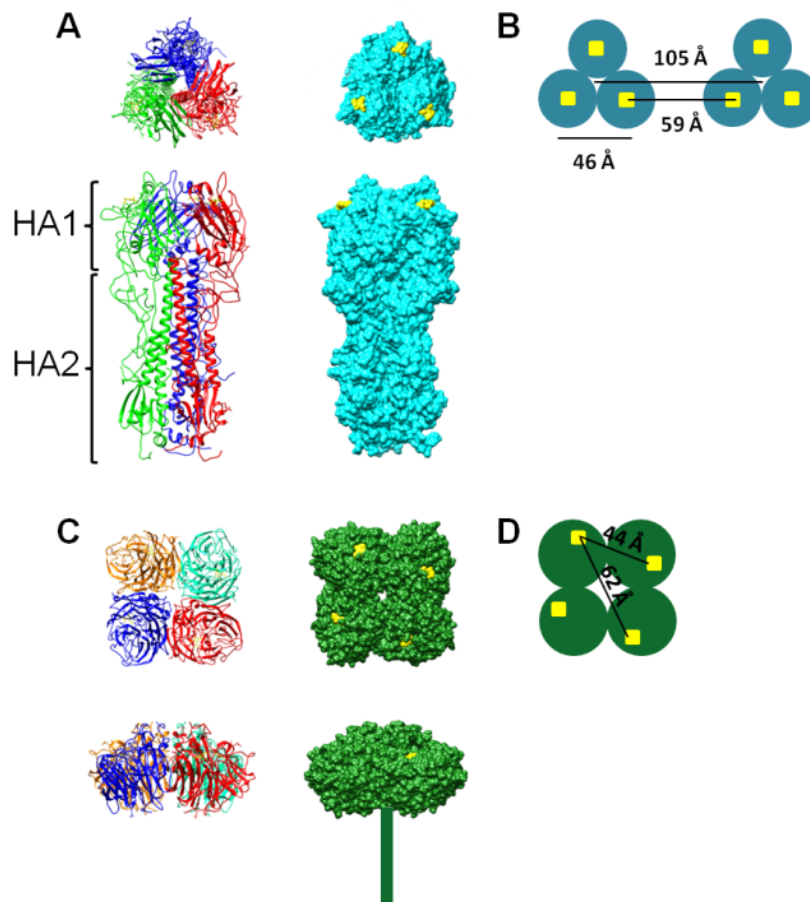


Abbildung 2: Struktur von HA und NA. A) Kristallstruktur und Topologie des HA-Trimers von A/X31 (H3N2) (PDB:2VIU). In der oberen Reihe ist die Aufsicht und in der unteren Reihe die Seitenansicht von HA dargestellt. B) Schematische Darstellung der Aufsicht von zwei HA-Trimeren (cyan) mit den kanonischen SA-Bindetaschen (gelb) und den gemessenen Abständen der Bindetaschen zueinander. C) Kristallstruktur und Topologie des NA-Tetramers von A/Tanzania/205/2010 (H3N2) (PDB:4GZQ) in der Aufsicht (obere Reihe) und Seitenansicht (untere Reihe). Die nicht kristallisierte Stammregion wurde schematisch dargestellt. D) Skizzierung der Aufsicht eines NA-Tetramers und gemessenen Abständen der SA-Bindetaschen (gelb). Bei der Bestimmung der Bindetaschenabstände (B, D) wurde der direkte Weg zwischen den Mittelpunkten der SA-Bindetaschen mit der Software Chimera anhand der Kristallstruktur und TEM-Aufnahmen der IAV-Korona ermittelt.

Bei der Neuraminidase (NA) handelt es sich um ein homotetrameres Glykoprotein mit Transmembrandomäne vom Typ-1 ([Shtyrya, Mochalova et al. 2009](#), [Air 2012](#)). NA weist eine pilzähnliche Struktur mit einem Propellerkopf und einer flexiblen Stammdomäne auf (Abbildung 2 C). Außerdem besitzt jedes NA-Monomer ein katalytisches Aktivitätszentrum an der Obersei-

te der Kopfdomäne. Die Abstände zwischen den SA-Bindetaschen eines NA-Tetramers betragen 44 oder 62 Å (Abbildung 2 D). Die katalytische Aktivität ist sehr gering ($k_{\text{cat}}=0,492/\text{s}$) ([Zhu, McBride et al. 2012](#)). Die Affinität gegenüber α -2,6-Sialyllactose ist im Vergleich zu HA fünfmal höher ($K_m = 520 \mu\text{M}$) ([Air 2012](#)). NA besitzt eine Vielzahl an biologischen Funktionen ([Yang, Liu et al. 2016](#)). Die katalytische Aktivität von NA unterstützt den Durchtritt von Influenzavirionen durch ein schützendes Glykopolymernetzwerk (Muzinschicht) auf dem Lungenepithel ([Matrosovich, Matrosovich et al. 2004](#), [Cohen, Zhang et al. 2013](#), [Yang, Steukers et al. 2014](#)). Weiterhin konnten Funktionen von NA beim viralen Assemblierungsprozess ([Rossman and Lamb 2011](#)), bei der Fusion ([Su, Wurtzer et al. 2009](#)) und bei der Freisetzung von neu entstandenen Viruspartikeln von der Wirtszellmembran nachgewiesen werden ([Calder, Wasilewski et al. 2010](#)). Auch eine Virusaggregation durch Interaktion von HA mit Glykostrukturen anderer Virionen wird durch die katalytische Aktivität von NA vermieden ([Wagner, Wolff et al. 2000](#)). Für die NA-Varianten N10 und N11 konnte bisher keine Bindung gegenüber Sialosiden nachgewiesen werden und über deren Funktion in der viralen Replikation wird noch spekuliert ([Mehle 2014](#)). Da aktuelle humanpathogene Virusisolate des Typs H3N2 einen verstärkt durch NA-vermittelten Hämagglutinationscharakter aufweisen, der sich anhand einer erhöhten Sensitivität gegenüber Neuraminidaseinhibitoren zeigte, wurde der katalytischen NA-Region auch eine Funktion bei der Bindung zugesprochen ([Lin, Gregory et al. 2010](#), [Mogling, Richard et al. 2017](#)). Auch für NA wurde eine zweite, nichtkatalytische Bindestelle beschrieben, die vermutlich durch ihren Hämadsorptionscharakter im Wesentlichen einen Beitrag zur Bindung von Viren an Erythrozytenmembranen spielt ([Sung, Van Wynsberghe et al. 2010](#)). Diese Eigenschaft wurde bisher nur bei aviärpathogenen Stämmen gefunden. Über die Funktion von NA bei Bindung an und Fusion in der Wirtszelle wird noch spekuliert, ([Lin, Gregory et al. 2010](#), [Yang, Liu et al. 2016](#)) jedoch weist das Vorkommen charakteristischer Kombinationen aus HA und NA darauf hin, dass es ein abgestimmtes Gleichgewicht beider Glykoproteine bei der Bindung und Zerstörung von Rezeptoren geben muss, damit eine erfolgreiche Infektion ablaufen kann ([Wagner, Matrosovich et al. 2002](#)).

Ein weiterer Bestandteil der Virusmembran ist das Matrixprotein-2 (M2) ([Pielak and Chou 2011](#)). Hierbei handelt es sich um einen tetrameren Protonenkanal, der den Transport von Protonen in das Viruslumen ermöglicht ([Cross, Dong et al. 2012](#)). Über eine stufenweise Absenkung des pH-Werts in den Endosomen ([Li, Sieben et al. 2014](#)) und der damit verbundenen Ansäuerung des Viruslumen über den M2-vermittelten Protonenimport, wird das multimerere Matrixprotein-1 (M1) Proteinkapsid denaturiert und disassembliert. Auf diesem Weg wird das virale Genom in das Wirtszellzytoplasma freigesetzt ([Pielak and Chou 2011](#)). Dieser Vorgang wird auch als „Uncoating“ bezeichnet. Neben seiner Funktion als Protonenkanal wird M2 auch eine wichtige Rolle beim Budding zugewiesen ([Rossman and Lamb 2011](#)). Nach dem Uncoating

werden acht Virusgenomsegmente, die von viralem Nukleoprotein (NP^{IAV}) umlagert sind und als virale Ribonukleoproteinkomplexe (vRNP) vorliegen, freigesetzt. Diese acht Genomsegmente codieren später für 11 virale Proteine ([Howley and Knipe 2007](#)): Neben den genannten membranständigen Proteinen HA, NA und M2, sowie M1, synthetisieren Influenzaviren das immunmodulierende Protein NS1 (engl. *nonstructural 1*), das für den Export viraler Ribonukleoproteinpartikel (vRNP) benötigte NEP (engl. *nuclear export protein*, welches auch als NS2 bezeichnet wird), das Nukleoprotein NP^{IAV}, drei Polymeraseproteine (engl. *polymerase basic*, *PB1* und *2*, sowie *polymerase acid PA*), sowie das proapoptotische Protein PB1-F2 ([Howley and Knipe 2007](#)). Neben viralen Proteinen enthält das Virus auch eine Vielzahl an Wirtszellproteinen, über deren Rolle bei der Virusinfektion noch spekuliert wird ([Hutchinson, Charles et al. 2014](#)).

1.1.5 Replikationszyklus

Bei der Infektion durchläuft das Virus mehrere Replikationsphasen (Abbildung 3): Zelleintritt, Replikation, Reifung und Freisetzung. Der Zelleintritt kann weiter in Zellbindung, Membranfusion und Uncoating unterteilt werden.

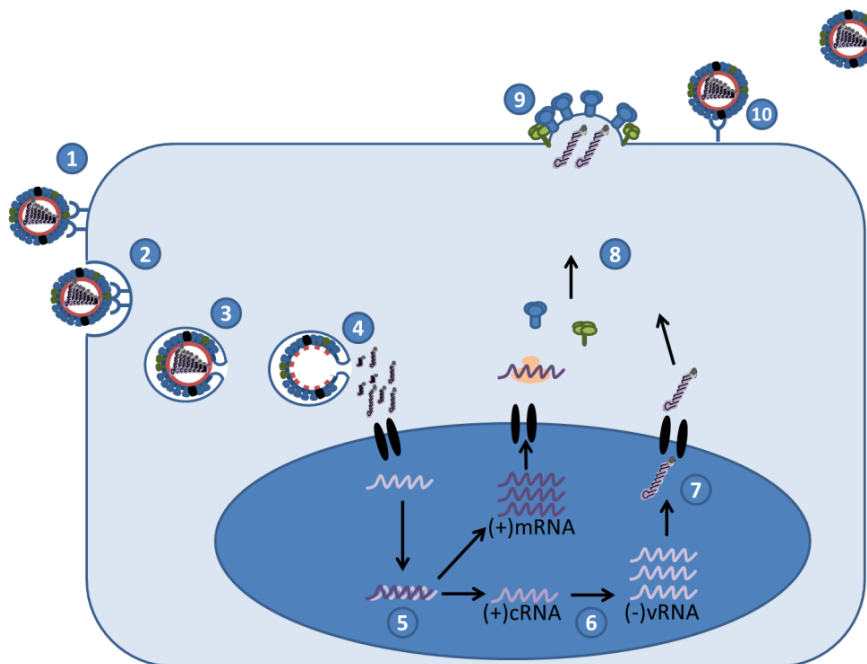


Abbildung 3: Schematische Darstellung des IAV-Replikationszyklus. Die Infektion einer Zelle durch IAV beginnt mit der Bindung an SA-Rezeptoren auf der Wirtszellmembran (1). Gebundene Viren werden mittels Endozytose in die Zelle aufgenommen (2). Im Zuge einer Endosomenreifung wird das Endosomenlumen angesäuert, wodurch Virus und Endosomenmembran in einem HA vermittelten Prozess miteinander fusionieren (3). Des Weiteren werden Protonen aus den Endosomen in das Viruslumen über den M2-Protonenkanal geleitet, was zu einer Deassemblierung des M1-Proteinkapsids und der Freisetzung der acht vRNP-Segmente ins Zytoplasma führt (4). Die vRNP-Segmente, die antisense RNA enthält, gelangen in den Zellkern und werden dort über die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRP) in

(+)cRNA oder in (+)mRNA umgeschrieben (5). Die (+)cRNA dient als Vorlage für die Synthese neuer Virusgenomsegmente (6), während die mRNA im Zytoplasma für neue Virusproteine codiert. Neu assemblierte vRNP-Genomsegmente gelangen über einen Export aus dem Zellkern wieder ins Zytoplasma und von dort über einen gerichteten Transport an die Wirtszellmembran (8), an der gemeinsam mit weiteren viralen Proteinen eine Virusassemblierung stattfindet. Die Assemblierung mündet schließlich in einer Membranausstülpung (engl. *budding*) und einer Abschnürung neuer Virionen von der Wirtszellmembran bzw. von den SA-Rezeptoren der Zellmembran durch NA (10).

IAV bindet über HA an auf Zellen exponierten Sialosiden mittels einer multivalenten Wechselwirkung. Die Dissoziationskonstante einer monovalenten SA-HA Bindung stellt mit ca. 2,8 mM eine äußerst schwache Interaktion dar ([Sauter, Bednarski et al. 1989](#)), ist aber nicht unüblich für monovalente Lektin-Zuckerinteraktionen ([Dam and Brewer 2002](#)). Erst durch eine multivalente Bindung des Virus an die Wirtszellglykokalyx kann die Bindungsaffinität wesentlich verstärkt werden. Whitesides und Mitarbeiter schätzten einen Verstärkungsfaktor β von 10^8 für eine multivalente Bindung von Influenzaviren an Zellen im Vergleich zu einer monovalenten SA-HA Interaktion ([Mammen, Choi et al. 1998](#)). Für SV40-Viren konnte gezeigt werden, dass eine multivalente Bindung genügend Kraft liefert, um eine Membrankrümmung zu induzieren ([Ewers, Romer et al. 2010](#)). Für IAV gibt es diesbezüglich noch keine Publikationen, jedoch sollten diese Viren prinzipiell auch in der Lage sein eine Membrankrümmung zu verursachen.

Nach der Bindung von IAV an eine Zelle kann sich das Virus über einen „bind-and-glide“ Mechanismus auf der Zelloberfläche hin zum Zielort der Endozytose bewegen ([Sakai, Nishimura et al. 2017](#)). Dabei wirken HA und NA als „molekulare Motoren“ für die Beweglichkeit von Viren auf der Zelloberfläche. Danach können Influenzaviren über verschiedene Aufnahmewege in die Zelle gelangen: Neben der Clathrin-vermittelten Endozytose als hauptsächlicher Aufnahmeweg für Influenzaviren können diese Viren auch Caveolin-vermittelt oder über Makropinozytose in die Zelle aufgenommen werden ([Lakadamyali, Rust et al. 2004](#)). Für den Clathrin-vermittelten Endozytoseweg wurde eine IAV-vermittelte Gruppierung von SA-tragenden epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren (engl. *epidermal growth factor receptor*, kurz: EGFR) als relevant für die Aufnahme von Influenzaviren beschrieben. Endozytierte Viren gelangen somit in von Zellmembran umschlossenen Zellorganellen, den Endosomen. Diese durchlaufen einen Reifungsprozess von frühen zu späten Endosomen, im Verlauf dessen das endosomale Lumen schrittweise bis auf pH 5 azidifiziert wird ([Li, Sieben et al. 2014](#)). Durch diesen Vorgang wird die HA1-Domäne protoniert, was zu einer Ablösung dieser Domäne von der HA2-Domäne führt, die in Folge dessen ihre Struktur entfaltet ([Xu and Wilson 2011](#)). Dabei penetriert der hydrophobe N-Terminus der HA2-Domäne („Fusionspeptid“) die endosomale Membran und initiiert durch einen Umfaltungsmechanismus mit der Virusmembran die Fusion. Zahlreiche Studien weisen darauf hin, dass für diesen Schritt mehr als ein HA-Trimer (Fusionseinheit) notwendig ist. Die Fusionseinheit führt dabei über einen kooperativen Mechanismus zur Memb-

ranverschmelzung. Die Anzahl an HA-Trimeren, die eine Fusionseinheit bilden wird kontrovers diskutiert, da verschiedene Forschergruppen diesbezüglich zu unterschiedlichen Erkenntnissen kamen ([Hamilton, Whittaker et al. 2012](#)).

Im letzten Schritt des viralen Zelleintritts findet das sogenannte „Uncoating“ statt. Durch die M2-vermittelte Ansäuerung des Viruslumen wird das M1-Kapsid zerstört und das virale Genom ins Zytoplasma freigesetzt ([Li, Sieben et al. 2014](#)).

Mittels Diffusion gelangen dann die vRNP-Segmente in den Zellkern, wo die Replikation des viralen Genoms und die Transkription ablaufen. Ausgehend von einer (-)RNA kann direkt virale mRNA transkribiert werden. Für die Synthese neuer vRNA benötigt das Virus jedoch einen Zwischenschritt über ein (+)cRNA-Templat. Nach Assemblierung der vRNP-Segmente im Zellkern gelangen letztere über einen Zellkernexport ins Zytosol ([Boulo, Akarsu et al. 2007](#)) und werden an Rab11 positiven Vesikeln mittels Mikrotubulitransport zur apikalen Membran der Zelle transportiert ([Eisfeld, Neumann et al. 2015](#)). Dort assemblieren alle Virusbestandteile und schnüren sich von der Zelle ab („budding“). Durch NA-Aktivität werden neu gebildete Viren von der Wirtszellglykokalyx geschnitten („release“), um sich weiter im Wirt zu verbreiten ([Air 2012](#)).

1.2 Infektionshemmung von Influenza A Viren

1.2.1 Antivirale Strategien

Gegen IAV sind viele antivirale Substanzen beschrieben worden, die an verschiedenen Stellen des viralen Replikationszyklus angreifen. Davon haben jedoch nur wenige eine klinische Verwendung erreichen können ([Van de Wakker, Fischer et al. 2017](#), [Wu, Wu et al. 2017](#)). Bis dato sind in den westlichen Ländern zwei Medikamente aus der Gruppe der Neuraminidaseinhibitoren (NAI) (Zanamivir und Oseltamivir), sowie der M2-Protonenpumpenhemmer (Amantadin) zugelassen. In Russland und China wird auch der Fusionsinhibitor Arbidol eingesetzt ([Blaising, Polyak et al. 2014](#)). Darüber hinaus führen solche Wirkstoffe, die klinisch eingesetzt werden, zu einer zunehmenden Entstehung von Resistenz, wodurch sich neue Virusmutanten entwickeln können ([Hussain, Galvin et al. 2017](#)). Um dieser Problematik entgegenzuwirken, müssen regelmäßig neue Derivate (bspw. die NAI Peramivir und Laninamivir) bekannter Wirkstoffe gegen Influenzaviren entwickelt werden ([Hussain, Galvin et al. 2017](#)). Dies gilt auch für Vakzine und IAV-neutralisierende Antikörper. Jährlich müssen neue Impfstoffe gegen die saisonale Grippe entwickelt werden und selbst Antikörper, die an essentielle Bindestellen des HA-Moleküls binden, können durch eine Resistenzentwicklung ihre Wirkung verlieren ([Fleury, Wharton et al. 1998](#), [Sano, Aina et al. 2017](#)). Aufgrund der rasanten Resistenzentwicklung der Influenza A Viren scheint die Forschung gegen diese Viren einen nimmer endenden Kampf zu

führen. Die Suche nach neuen antiviralen Substanzen oder Strategien hat daher eine hohe Priorität, um dem koevolutiven Verhalten des Influenzavirus entgegenzuwirken.

Antivirale Wirkstoffe können je nach Substanzklasse und Angriffspunkt in mehrere Gruppen unterteilt werden: Zunächst unterscheidet man zwischen solchen Substanzen, die direkt auf das Influenzavirus wirken (bspw. NAI), solche die für das Virus essentielle Wirtszellfaktoren herunterregulieren, blockieren oder in ihrer Aktivität modulieren, sowie immunstimulierende bzw. -hemmende Wirkstoffe. Bei einer direkten antiviralen Therapie wird eine gerichtete Selektion, welche mit der Entwicklung von Resistenzen einhergeht, verursacht. Bei einer indirekten, wirtsgerichteten Therapie hingegen kann dieser Umstand umgangen werden. Mithilfe von RNAi basierten Screeningverfahren, konnten nicht toxische und für die Replikation von Influenzaviren essentielle Wirtsfaktoren, wie z.B. p24 und Mantelproteinkomplex-Untereinheiten (engl. *coat protein complex I*, kurz: COPI) identifiziert werden ([Karlas, Machuy et al. 2010](#), [König, Stertz et al. 2010](#)). Experimente mit spezifischen Proteininhibitoren gegen diese Wirtsfaktoren und mit p24-Knockout-Mäusen validierten die identifizierten Proteine als antivirale Angriffspunkte. Immunsupprimierende Substanzen, wie z.B. Kortikosteroide hingegen, wirken unspezifisch und systemisch, finden jedoch immer noch Verwendung in der Klinik, um eine Überreaktion des Immunsystems (Zytokinsturm) abzuschwächen ([Liu, Zhou et al. 2016](#)), vor allem dann, wenn nicht genügend Zeit für Diagnostik vorhanden ist. Alternativ zu antiinflammatorischen Substanzen stellten sich diverse Immunisierungsstrategien oder HA bindende Antikörper als erfolgreich heraus ([Shriver, Trevejo et al. 2015](#), [Sano, Ainai et al. 2017](#)). Immuntherapien können jedoch auch gefährlich sein, da eine Immunreaktion in Patienten auf eine solche Medikation nicht prognostiziert werden kann. Darüber hinaus können bei Patienten mit schwachem Immunsystem solche Verfahren nicht eingesetzt werden.

Spezifisch gegen das Virus gerichtete Substanzen hingegen wirken an verschiedenen Stellen des viralen Replikationszyklus. So gibt es neben NAI außerdem sogenannte „Entryblocker“, die dem Eintritt der Viren in die Wirtszelle entgegenwirken. Dies geschieht durch Bindung an sensible Regionen des viralen Glykoproteins HA. Auf solche Inhibitoren, die Einfluss auf die Aktivität von HA haben, wird im folgenden Abschnitt näher eingegangen. Des Weiteren gibt es Substanzen, die infektionsmindernd mit der Virusinternalisierung in die Zelle (z.B. Dynasore), der intrazellulären Virusreplikation (z.B. Ribavirin) und dem Transport von viralen Strukturen innerhalb der Zelle (z.B. Verdinexor) wirken ([Van de Wakker, Fischer et al. 2017](#)).

Unspezifische, virusgerichtete Inhibitoren, wie z.B. das Peptid Mucroporin-M1 aus dem Gift des Skorpions *Lychas mucronatus*, weist breitwirksame, viruzide Eigenschaften auf, die auch gegenüber Masernviren oder MERS-CoV eine Wirksamkeit zeigen ([Li, Zhao et al. 2011](#)). Viruzide Substanzen wechselwirken in der Regel mit der Lipidmembran umhüllter Viren oder füh-

ren zu einer Denaturierung oder Deassemblierung von Viruskapsiden unbehüllter Viren. Eine neuere Substanzklasse stellen starre amphiphile Fusionsinhibitoren (engl. *rigid amphiphilic fusion inhibitor*, RAFI) dar, die die Membranfluidität von umhüllten Viren erhöhen und dadurch die Fusionsaktivität herabsetzen ([Colpitts, Ustinov et al. 2013](#)).

1.2.2 Hämagglutinin als antivirale Zielstruktur

IAV Hämagglutinin gehört zu den am besten charakterisierten Proteinen. Wie im Abschnitt 1.1.5 bereits beschrieben, ist HA essentiell für die Virusbindung und -fusion. Antivirale Strategien, die die Aktivität von HA beeinflussen, greifen demzufolge bereits an den ersten Schritten des viralen Replikationszyklus an. HA kann über verschiedene Mechanismen inhibiert werden: Hemmung der Fusionsaktivität, Blockierung der SA-HA Interaktion oder Verhinderung der Proteinreifung. Inhibitoren (z.B. Arbidol), die über eine Bindung an die HA2-Region den Präfusionszustand von HA stabilisieren, sind in der Lage eine virale Fusion zu unterbinden, indem die für die Fusion notwendige pH-abhängige Konformationsänderung von HA beeinträchtigt wird. Der genaue Inhibitionsmechanismus des Fusionsinhibitors Arbidol wurde erst kürzlich beschrieben ([Kadam and Wilson 2017](#)). Darüber hinaus konnten auch antivirale HA2 bindende Peptide aus *in silico* „Docking“ Studien entwickelt werden ([Lopez-Martinez, Ramirez-Salinas et al. 2013](#)).

Eine weitere antivirale Strategie ist die Blockierung der SA-Bindestelle mit rezeptoranalogen Strukturen, wodurch eine Interaktion mit Zellen unterbunden werden kann. Da eine monovalente SA-HA-Interaktion sehr schwach ist (2,8 mM), ist der Einsatz von monovalenter SA als Bindungskompetitor jedoch ineffizient. Eine Studie mit artifiziellen SA-Derivaten belegte jedoch, dass eine monovalente Kohlenhydrat-Lektinwechselwirkung nicht zwingend millimolare Affinitätswerte aufweisen muss. Durch eine Derivatisierung von Sialinsäuren mit aromatischen Gruppen war es möglich, 64-fach geringere KiHAI-Werte gegenüber A/X31 (H3N2) zu erreichen ([Toogood, Galliker et al. 1991](#)). Über eine multiple Präsentation von monovalenten Bindern können Inhibitoren gewonnen werden, die über eine multivalente Wechselwirkung mit SA-Bindestellen von HA höhere Affinitätswerte erzielen (siehe Abschnitt 1.3.2).

Neben Zucker basierten Bindern wurden auch eine Reihe von Peptiden und Aptamere beschrieben, die eine Virus-Zellinteraktion durch eine Bindung an die HA1-Domäne blockieren. Solche Binder erreichten teilweise sogar nanomolare Bindungsinhibitionswerte gegenüber spezifischer HA-Varianten ([Jeon, Kayhan et al. 2004](#), [Gopinath, Misono et al. 2006](#), [Rajik, Omar et al. 2009](#)). Weitere Vorteile solcher Virusbinder sind die einfache synthetische Gewinnung, Adaptierbarkeit bei Resistenzentwicklung und die über zahlreiche Methoden zugängliche Identifikation (Abschnitt 1.3.3).

Auch Antikörper sind aufgrund ihrer gut beschriebenen pharmakologischen Eigenschaften, hoher Affinität und multifunktionalen Eigenschaften, wie z.B. Neutralisierung, Aktivierung von Komplementfaktoren des Immunsystems, Aktivierung der antikörperabhängigen Zytotoxizität attraktive, antivirale Proteine. Besonders sogenannte breitneutralisierende Antikörper, die durch Bindung innerhalb der verschiedenen HA-Varianten hochkonservierte Bereiche (häufig die HA2-Domäne) adressieren, haben zunehmend an Interesse gewonnen. Für den Antikörper ME-DI8852 bspw. konnten virusneutralisierende Eigenschaften gegenüber 16 HA-Varianten gezeigt werden ([Kallewaard, Corti et al. 2016](#)). Bisweilen haben es auch einige Antikörper in die klinische Phasen von Arzneimittelstudien geschafft ([Corti, Cameroni et al. 2017](#)).

Die Gewinnung von IAV neutralisierenden Antikörpern kann auch über Impfstoffe erreicht werden, da es durch Immunisierung mit IAV eine humorale Immunantwort provoziert werden kann. Aufgrund der hohen Mutationsrate von IAV müssen jedoch jährlich neue Vakzine gegen die saisonale Grippe entwickelt werden. Die Erstellung eines breitwirksamen Impfstoffes konnte noch nicht realisiert werden, jedoch wird intensiv daran geforscht ([Park and Taubenberger 2016](#)).

Eine weitere Option zur Beeinträchtigung einer Virus-Zellinteraktion ist es, die SA-Rezeptoren zu zerstören oder zu blockieren. Die Sialidase DAS181 zeigte über die Hydrolyse von SA auf Zellen ein hohes antivirales Potential und erreichte sogar die zweite klinische Phase ([Nicholls, Moss et al. 2013](#)). Auch SA bindende Lektine oder aus einem Phagedisplay gewonnene Peptide zeigten hohe antivirale Wirksamkeiten *in vitro* und im Falle des Lektins sogar im Mausmodell ([Matsubara, Sumi et al. 2009](#), [Connaris, Govorkova et al. 2014](#)).

Antivirale Strategien, die HA bereits im Proteinreifungsprozess adressieren, wurden ebenfalls beschrieben. *In vitro* führte bspw. der Glykosylierungsinhibitor Tunicamycin zur Expression von fehlgefaltetem HA ([Schwarz, Rohrschneider et al. 1976](#)). Aufgrund einer unspezifischen Wirkung und hohen erforderlichen Dosis ist jedoch von einer Wirkstoffentwicklung abzusehen. Die Inhibition von Trypsin ähnlichen Wirtsproteasen, die für die proteolytische Aktivierung von HA notwendig ist, stellt einen weiteren antiviralen Angriffspunkt dar. Der Proteaseinhibitor HAI-2 demonstrierte *in vitro* und im Tiermodell eine antivirale Wirkung gegenüber H1 und H3 IAV-Subtypen ([Hamilton, Chung et al. 2014](#)).

1.3 Multivalenz

1.3.1 Prinzipien der Multivalenz

Multivalenz beschreibt die simultane Interaktion von zwei oder mehr verknüpften Rezeptoren mit einem Verbund an komplementären Ligandeneinheiten. Die Verknüpfung der Rezeptoren

untereinander kann über einen Linker erzielt werden. Über diesen Linker kann der Abstand zwischen den Rezeptoren und die Flexibilität der räumlichen Orientierung der Rezeptoren definiert werden. Handelt es sich dabei um Interaktionen derselben Rezeptorspezies spricht man von Homomultivalenz, basiert die Wechselwirkung auf mindestens zwei unterschiedliche Liganden-Rezeptorinteraktionen spricht man von Heteromultivalenz. Das Prinzip der Multivalenz ist weit verbreitet in der Natur und lässt sich auf diversen Größendimensionen antreffen: Auf makroskopischer Ebene kann die Multivalenz bspw. bei Betrachtung eines Klettensamens, der über eine multiple mechanische Wechselwirkung kleiner Haken an dem Tierfell eines vorbeischießenden Säugers adhärert, beobachtet werden. Auch auf mikroskopischer Ebene lassen sich viele Zell-Zell-, Virus-Zell-, Bakterien-Zellinteraktionen auf eine multivalente Beziehung zurückführen.

Der allgemeine Mechanismus dahinter ist einfach: Eine schwache Interaktion zwischen einem Rezeptor-Ligandenpaar kann über eine multivalente Interaktion drastisch verstärkt werden. Dieses Prinzip tritt vor allem bei einer Lektin-Kohlenhydratwechselwirkung auf. Das Influenza-HA bspw., bei dem es sich ebenfalls um eine lektinartige Struktur handelt, weist eine äußerst geringe Bindungsaffinität gegenüber monovalenter Sialinsäure bzw. deren natürlichen Derivate auf ([Sauter, Bednarski et al. 1989](#)). Erst durch eine orchestrierte Interaktion multipler HA-Trimere auf der Virusoberfläche mit Sialinsäureeinheiten auf einer Zelloberfläche kommt es zu einer massiven Bindungsverstärkung. Whitesides und Mitarbeiter führten zur Beschreibung der verstärkenden Wirkung einer multivalenten Wechselwirkung gegenüber einer monovalenten Rezeptor-Ligandeninteraktion den Verstärkungsfaktor β ein ([Mammen, Choi et al. 1998](#)). Im Falle des Influenzavirus wurde ein Verstärkungsfaktor von 10^8 bei der Bindung von A/X31 (H3N2) Viren an Zellen geschätzt.

Die der Multivalenz zugrundeliegenden Merkmale sind jedoch hoch komplex und bislang nur eingeschränkt verstanden. Ein erstes umfassendes thermodynamischen Multivalenzmodell wurde von Krishnamurthy und Kollegen vorgeschlagen ([Krishnamurthy, Estroff et al. 2006](#)):

$$(1) \quad \Delta G_N^0(i) = i\Delta H_{Affinität}^0 - iT\Delta S_{Affinität}^0 + (i-1)T\Delta S_{Trans+Rot}^0 + (i-1)\Delta H_{Linker}^0 - (i-1)T\Delta S_{Konf}^0 + (i-1)\Delta G_{Koop}^0 - RT\ln\left(\frac{\Omega_i}{\Omega_0}\right)$$

Hierbei setzt sich die freie Bindungsenthalpie ($\Delta G_N^0(i)$) für eine multivalente Interaktion mit N Rezeptoren über eine Funktion mit gebundenen Rezeptoren (i) aus mehreren Termen zusammen. Der erste Term ($i\Delta H_{Affinität}^0$) beschreibt das Produkt aus der Anzahl an gebundenen Liganden und der Bindungsenthalpie einer monovalenten Interaktion. Der zweite Term ($-iT\Delta S_{Affinität}^0$) berücksichtigt das Produkt der monovalenten Bindungsentropie mit der Anzahl an gebundenen

Rezeptoren (i). Die Differenz der ersten beiden Terme beschreibt die freie Bindungsenthalpie, die aus der Anzahl an Rezeptor-Ligandenpaaren resultieren würde, wenn diese nicht über einen Linker verbunden wären. Der dritte Term $((i-1)T\Delta S^0_{\text{Trans+Rot}})$ beschreibt die Rotations- und Translationsentropie und repräsentiert den „Chelat-Effekt“. Er berücksichtigt die Beziehung zwischen Bindungsenthalpie und Bindungsentropie (Enthalpie-Entropiekompensation). Der vierte Term $((i-1)\Delta H^0_{\text{Linker}})$ beschreibt die Bindungsenthalpie des Linkers, die aus dem Kontakt mit dem Liganden (bspw. HA) resultiert. Der fünfte Term $(-(i-1)T\Delta S^0_{\text{Konf}})$ bezieht sich auf den Verlust der Konformationsentropie, die über die Länge und die Flexibilität des Linkers determiniert ist. Der sechste Term $((i-1)\Delta G^0_{\text{Koop}})$ umschreibt die freie Bindungsenthalpie, die aus Kooperationseffekten resultiert. Da für die meisten multivalenten Interaktionen geringe oder keine Kooperations-effekte nachgewiesen werden konnten, ist dieser Term häufig nahe null. Der siebte und letzte Term umfasst einen statistischen Faktor, der die Entartung (Ω) bzw. Auflösung und Neubildung von Rezeptor-Ligandenpaaren berücksichtigt.

Eine Verbindung zwischen der freien Bindungsenthalpie und der Gesamtheit der Affinität eines multivalenten Binders (Avidität) wird über die *Gibbs*-Gleichung beschrieben:

$$(2) \quad \Delta G^0_{\text{Avidität}}(i) = -RT \ln(K_d^{\text{Multi}})$$

Dabei steht $\Delta G^0_{\text{Avidität}}(i)$ für die Änderung der freien Bindungsenthalpie einer multivalenten Wechselwirkung und K_d^{Multi} für die Dissoziationskonstante, welche die Avidität eines multivalenten Binders repräsentiert.

Durch Gleichsetzung von Gleichung 2 und 1 folgt, dass bei einer multivalenten Wechselwirkung geringe Dissoziationskonstanten (hohe Avidität) über eine geringe Gesamtenthalpieⁱ ($i\Delta H^0_{\text{affinity}}$) und kleinen Beträgen für die Gesamtentropie (ΔS^0_{ges}) gewonnen werden können ([\(Krishnamurthy, Estroff et al. 2006\)](#)). Die Gesamtentropie bezieht sich auf die Summe der Entropieterme in Gleichung 1.

Bei einer multivalenten Interaktion kann die Bindungsenthalpie über die Affinität des monovalenten Rezeptors und die Anzahl für die Bindung zur Verfügung stehenden Rezeptoren verringert werden. Für eine optimale multivalente Interaktion muss die Rezeptordichte jedoch auf die Ligandendichte der Zielstruktur abgestimmt werden. Zu geringe Rezeptordichten bilden weniger Rezeptor-Ligandenpaare aus als möglich und haben daher eine geringere Affinität als solche Binder, die über eine höhere bzw. angepasste Rezeptordichte mit den räumlichen Gegebenheiten

ⁱ Der Enthalpiebeitrag des Linkers wurde hierbei vernachlässigt.

ten der multivalenten Zieloberfläche optimal interagieren können. Jedoch können auch zu hohe Rezeptordichten zu einer Abnahme der Affinität führen, da nicht gebundene Rezeptoren zu einer sterischen Abstoßung der multivalenten Interaktion führen können. Eine optimale Rezeptordichte gegenüber einer multivalenten Zielstruktur gilt es vor allem mit statistischen Rezeptor-Polymerkonjugaten zu identifizieren. Diese Strategie zur Verbesserung eines multivalenten Binders ist besonders dann vorteilhaft, wenn die exakten räumlichen Gegebenheiten der Zielstruktur nicht ausreichend charakterisiert sind oder Trägersysteme gewählt werden, die keine exakte Rezeptorpositionierung erlauben (siehe Abschnitt 1.3.2).

Ist die Zielstruktur bzw. die räumliche Distanz der Ligandeneinheiten ausreichend charakterisiert, kann entsprechend einer definierten Rezeptorausrichtung auf starren Gerüstsystemen die Affinität weiter optimiert werden. Diese Strategie zielt darauf ab, die Rezeptorbeweglichkeit durch Einschränkung der Rotations- und Translationsfreiheitsgrade zu verringern. Dadurch wird der Energieverlust durch die Konformationsentropie (ΔS_{Konf}^0) minimiert. Jedoch kann die Einschränkung der Rezeptorbeweglichkeit auch mit einer entropischen Bestrafung bzw. mit einer Erhöhung der freien Bindungsenthalpie einhergehen, wenn die räumliche Rezeptorausrichtung nicht auf die Zielstruktur abgestimmt ist. Dadurch kann es zu einer sterischen Abstoßung von Rezeptoren mit der Zielstrukturen an Stellen kommen, an denen keine Bindung stattfinden kann.

Im folgenden Abschnitt werden Beispiele für beide Optimierungstrategien (statistische oder räumlich ausgerichtete Rezeptordarstellung) für multivalente Inhibitoren aufgezeigt.

1.3.2 Multivalente Inhibitoren gegen das Influenzavirus

Da gegenwärtig die Grundlagen der Multivalenz noch nicht vollständig aufgeklärt sind, war es bisher nicht möglich allein auf der Basis einer Zielstruktur einen passenden Binder *ad hoc* zu synthetisieren ([Whitesides and Krishnamurthy 2005](#)). Aus diesem Grund müssen über Screeningverfahren Multivalenzträger mit geeigneter Größe, Struktur und Valenz in Wettbewerbs- und Affinitätsmessungen miteinander verglichen werden, um einen geeigneten Binder gegenüber einer bestimmten Zielstruktur zu identifizieren. Darüber hinaus spielen Toxizität und pharmakokinetische Eigenschaften für eine *in vivo* Anwendung eine wichtige Rolle. Aus diesen Messungen können jedoch weitere Einblicke über Prinzipien der Multivalenz gewonnen werden, welche bei der Erstellung eines Bauplans multivalenter Binder gegenüber einer gewünschten Zielstruktur hilfreich ist ([Fasting, Schalley et al. 2012](#)).

Gegenüber IAV wurden bereits zahlreiche multivalente Inhibitoren beschrieben, die über eine multiple Interaktion mit HA auf der Virusoberfläche wechselwirken. Mechanistisch können

multivalente Binder eine Zellbindung beeinträchtigen oder zu einer Aggregation von Viren führen. Neben natürlich vorkommenden IAV-Bindern, wie SA-tragende Proteine (z.B. Mucin, Fetuin, α 2-Macroglobulin), wurden eine Reihe multivalenter Binder auf Basis verschiedener, synthetischer Gerüstsysteme entwickelt ([Mammen, Choi et al. 1998](#)). Darunter befinden sich nichtkovalente SA-präsentierende Trägersysteme, wie Liposomen und kovalente Systeme, wie dendritische oder lineare Polymersysteme ([Mammen, Choi et al. 1998](#)). Alternativ zu einer Präsentation von SA wurden auch peptidfunktionalisierte, mizellare Binder oder dendritische Polyglycerolsysteme beschrieben ([Matsubara, Onishi et al. 2010](#), [Lauster, Pawolski et al. 2015](#), [Lauster, Glanz et al. 2017](#)). Für die Darstellung solcher multivalenten Binder werden Rezeptoren in einem bestimmten Verhältnis dem Trägersystemen vor der Reaktion zugesetzt, um eine bestimmte statistische Rezeptorverteilung bzw. einen bestimmten Funktionalisierungsgrad zu generieren. Durch das Testen derselben Gerüststrukturen mit unterschiedlicher Rezeptordichte haben sich bspw. in Bindungsexperimenten mit Influenzaviren bestimmte Rezeptordichten als vorteilhaft herausgestellt ([Mammen, Dahmann et al. 1995](#), [Kwon, Na et al. 2016](#), [Bhatia, Lauster et al. 2017](#)). Wie sich im Verlauf der vorliegenden Arbeit herausstellte, muss je nach Morphologie des Trägersystems (bspw. linear oder sphärisch) eine gerüstspezifische, optimale SA-Dichte für eine maximale Interaktion mit Influenzaviren identifiziert werden. Der bislang effizienteste multivalente IAV-Inhibitor ist ein lineares Polyacrylamidsialosid mit einem molaren SA-Anteil von ca. 20 %. In *in vitro* HAI-Experimenten konnte damit ein Inhibitionswert von 600 pM gemessen werden. Solche Inhibitoren sind aufgrund eines hohen Molekulargewichts (ca. 10 MDa) jedoch nicht für eine *in vivo* Anwendung geeignet, da eine Sekretion über die Niere nur eingeschränkt stattfinden kann und eine geringe Biodegradibilität zu hohen Residenzzeiten im Körper führen kann. Bei der Wahl eines geeigneten Trägersystems sollte der Aspekt der Biokompatibilität und vorübergehenden Stabilität gegenüber enzymatischem Abbau und oxidativem Stress für eine potentielle Anwendung in Tier und Mensch daher mitbeachtet werden. Bislang sind nur wenige multivalente Sialoside im Tiermodell gegenüber IAV erfolgreich getestet worden ([Gambaryan, Tuzikov et al. 2002](#), [Kwon, Na et al. 2016](#), [Bhatia, Lauster et al. 2017](#)).

Alternativ zu einer statistischen Rezeptorverteilung auf Polymersystemen können Rezeptoren auch strukturell angepasst über starre Gerüste präsentiert werden. Gegenüber IAV-HA konnte dies jedoch erst mit bivalenten und trivalenten Bindern umgesetzt werden. *Glick and Knowles* konnten in einer vergleichenden Studie mit bivalenten Sialosiden eine Abstandsabhängigkeit und den Einfluss der Linkerflexibilität ermitteln. Über eine SA-Separation von 57 Å mit einem im Vergleich zu PEG starren Glycinlinker konnte *in vitro* ein Inhibitionswert von 30 µM bestimmt werden ([Glick and Knowles 1991](#)). In einer weiteren Studie konnte ein passförmiges trivalentes Sialosid auf Basis eines Peptidgerüsts an HA aus H5N1 Viren angepasst werden,

wodurch nanomolare Bindungswerte erzielt werden konnten ([Waldmann, Jirmann et al. 2014](#)). Solch ein geringer Wert konnte mit statistischen Polymersystem nur mit weit höheren SA-Mengen erzielt werden.

Für eine strukturell definierte Rezeptorausrichtung eignen sich Biogerüstsysteme, wie doppelsträngige Nukleinsäuren oder Proteine (bspw. Q β -Phagenkapside), als hervorragende Multivalenzplattform ([Abendroth, Bujotzek et al. 2011](#), [Ribeiro-Viana, Sanchez-Navarro et al. 2012](#), [Scheibe, Wedepohl et al. 2013](#)). Die Eignung solcher starren Gerüstsysteme für eine multivalente Interaktion mit IAV und deren Vorteil gegenüber statistischen SA-Polymerkonjugaten wird im Rahmen der vorliegenden Arbeit demonstriert und diskutiert.

Für eine multivalente Bindungsinhibition ist jedoch nicht nur eine hohe Bindungsaffinität relevant. Über die Gerüstgröße oder Geometrie können zusätzlich sterische Abschirmungseffekte gewonnen werden, die eine Bindungsinhibition weiter erhöhen ([Mammen, Dahmann et al. 1995](#)). Die sterische Abschirmung beschreibt die Blockierung einer Liganden-Rezeptorinteraktion durch das rezeptortragende Gerüst. In Studien mit linearen Polyacrylamidsialosiden gegenüber IAV wurde dieser Effekt erstmals beschrieben ([Mammen, Dahmann et al. 1995](#)). Weiterführende Studien demonstrierten später, dass große sphärische Polyglycerole im Vergleich zu kleineren Bindungsinhibitoren ein höheres Inhibitionspotential herbeiführten ([Papp, Sieben et al. 2011](#)). Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine geringere Rezeptordichte besser für eine Bindung an IAV geeignet war als höhere Rezeptordichten. In einer weiteren Studie mit einem kombinierten experimentell-theoretischen Bindungsmodell konnte herausgefunden werden, dass ein sphärischer Inhibitor für eine optimale Bindungsinhibition ungefähr ein Drittel der Größe des zu bindenden Interaktionspartner besitzen muss ([Vonnemann, Liese et al. 2015](#)).

1.3.3 Methoden und Techniken für molekulare Interaktionsstudien

In den Lebenswissenschaften spielen Interaktionsstudien an Biomolekülen, wie zwischen Protein-Protein, Protein-Nukleinsäure, Protein-Kohlenhydrat, Protein-Lipid und anderen Interaktionspartnern eine wichtige Rolle. Die Identifikation einer Bindungsinteraktion liefert nicht nur relevante Erkenntnisse für Molekularbiologie oder Zellbiologie unter physiologischen Bedingungen, sondern auch unter pathophysiologischen Bedingungen. Um pathologische Prozesse, wie beispielsweise eine Infektion einer Zelle mit Influenzaviren unterbinden zu können, sind quantitative Bindungsmessungen unabdingbar für die Entwicklung von spezifischen und hoch-affinen Bindern.

Zur Untersuchung des Vorhandenseins einer Interaktion eignen sich zahlreiche qualitative und quantitative Methoden. Zu den qualitativen Methoden zählen bspw. „Pull-down“ Experimente mit an Nanopartikeln (bspw. Magnetkügelchen) immobilisierten Epitopen, Koimmunopräzipitationen, das Hefe-Zwei-Hybrid-System (engl. *Yeast Two-Hybrid System*), die bimolekulare Fluoreszenzkomplementation in lebenden Zellen, chemisches oder UV-Licht abhängiges Kreuzvernetzen, Affinitätschromatographien und neue Methoden mit Microarraychips ([Swatek, Lee et al. 2014](#), [Popova, Kurshakova et al. 2015](#), [Neiswinger, Uzoma et al. 2016](#)). Dabei ist zu bemerken, dass die genannten Methoden auch zu einem wesentlichen Anteil zu falsch positiven Ergebnissen führen können. Neben den aufgezählten Messverfahren, die eine direkte molekulare Wechselwirkung identifizieren können, werden häufig auch Kompetitionstests eingesetzt, um die Bindungsstärke eines Liganden an seinen Bindungspartner beschreiben zu können.

In der IAV Forschung erwiesen sich hierbei Kompetitionstests mit zellbasierten Methoden, wie dem Hämagglutinationsinhibitionstest (HAI) oder Festphasentests, als sehr hilfreich. Der HAI ist ein etabliertes Testverfahren zur Bestimmung des qualitativen und quantitativen Potentials von antiviralen Substanzen oder IAV-neutralisierenden Antikörpern in Blutseren ([Mammen, Dahmann et al. 1995](#), [Cross 2002](#)). Whitesides und Mitarbeiter zeigten in einer vergleichenden Studie mittels NMR und HAI, dass der ermittelte K_D -Wert für monovalente Liganden aus NMR-Experimenten der Inhibitionskonstante K_{HAI} aus dem HAI-Titrationsverfahren entspricht ([Mammen, Dahmann et al. 1995](#)). Aufgrund der einfachen Versuchsdurchführung erweist sich der HAI-Test daher als ein nützliches Verfahren zur Bestimmung von Bindungsstärken IAV-bindender Substanzen. Außerdem kann er durch die Verwendung von Erythrozyten aus verschiedenen Spezies für die Ermittlung der Serospezifität angewendet werden ([Ito, Suzuki et al. 1997](#)). Standardmäßig wird der HAI-Test mit vier Hämagglutinationseinheiten (engl. *Hemagglutination units*, kurz: HAU) durchgeführt. Da die minimale HA-Konzentration für eine Agglutination von Erythrozyten etwa 1 nM beträgt, können Inhibitionswerte, die kleiner als 1 nM sind, nicht aufgelöst werden ([Mammen, Choi et al. 1998](#)). Whitesides und Mitarbeiter entwickelten diesbezüglich den „optically controlled collision“ (OPTCOL)-Test, bei dem über eine molekulare Pinzette die Bindungswahrscheinlichkeit eines Virus an Erythrozyten in Gegenwart eines Inhibitors gemessen wird ([Mammen, Choi et al. 1998](#)). Damit war es möglich pikomolare Inhibitionswerte zu ermitteln.

Alternativ zu dem HAI-Test zeigten auch verschiedene Festphasenbindungstests Verwendung in der IAV-Forschung: Für die Ermittlung von Assoziationskonstanten (K_a) wurden multivalente Binder mit Peroxidase gekoppelt und gegen eine mit Influenzaviren beschichteten Oberfläche titriert. Mithilfe eines enzymgekoppelten Immunosorbenttests (engl. *enzyme linked immunosorbent assay*, kurz: ELISA) werden mit Peroxidase gekoppelte Antikörper in einem Bindungs-

kompetitionstest verwendet, um das Bindungsinhibitionspotential eines IAV-Binders zu ermitteln.

Sind beide Interaktionspartner bekannt, bieten sich viele Messverfahren zur Bestimmung der Affinität bzw. der Dissoziationskonstante (K_D) an. Der elektrophoretische Mobilitätsshifttest (engl. für *electrophoretic mobility shift assay*, kurz: EMSA) ist hierbei eine klassische semi-quantitative Methodik zur groben Bestimmung von Affinitätskonstanten. Moderne physikalische Verfahren erlauben hingegen eine hochpräzise Bestimmung von kinetischen und thermodynamischen Parametern für die Charakterisierung einer vorliegenden Bindung. Zu den üblichen Methoden zählen optische Verfahren, wie die Oberflächenplasmonresonanz (engl. *surface plasmon resonance*, kurz: SPR), die Fluoreszenz(kreuz)korrelationsspektroskopie (FC(C)S), Kernspinresonanzspektroskopie (engl. *nuclear magnetic resonance*, kurz: NMR), Anisotropie, Kraftspektroskopie, Interferometrie, diverse akustische Verfahren und die häufig in der Chemie eingesetzte isothermale Kalorimetrie und die mikroskalige Thermophorese (MST), auf die im nächsten Abschnitt genauer eingegangen wird.

Viele dieser Methoden wurden auch bei der Charakterisierung von multivalenten Bindern eingesetzt ([Mammen, Choi et al. 1998](#), [Bhatia, Lauster et al. 2017](#)). Dabei ist zu beachten, dass es bei hochvalenten Systemen bisher unmöglich war, die genaue Bindungsstöchiometrie zu ermitteln, welche einen essentiellen Parameter für die Auswahl eines geeigneten Bindungsmodells darstellt. Dies ist darin begründet, dass die Bestimmung der Interaktionsfläche bzw. der Anzahl an Liganden-Rezeptorpaaren einer multivalenten Interaktion mit großem Aufwand verbunden ist. Eine Deformierbarkeit von Nanopartikeln und deren Zieloberflächen, welche bei einer Interaktion je nach Flexibilität der Interaktionspartner mehr oder weniger stark zum Tragen kommt, erschwert weiter die Ermittlung des tatsächlichen Bindungsverhältnisses. Darüber hinaus unterliegen multivalente Interaktionen dynamischen Prozessen, die sich auf einen ständigen Wechsel von Interaktionspartnern zurückführen lassen ([Weber, Bujotzek et al. 2012](#)). Zur Vereinfachung können jedoch multivalente Interaktionen im Gleichgewichtszustand mit dem Langmuirmodell, welches eine monovalente Rezeptor-Liganden Interaktion beschreibt, erfasst werden. Da die exakte Rezeptor-Ligandenstöchiometrie multivalenter Bindungen unbekannt ist, werden in diesem Zusammenhang die ermittelten Affinitätswerte als apparente Dissoziationskonstanten ($K_{D,app}$) bezeichnet ([Bhatia, Lauster et al. 2017](#)). Die isothermale Kalorimetrie (engl. *isothermal calorimetry*, kurz: ITC) hingegen erlaubt die exakte Bestimmung von Dissoziationskonstanten, beansprucht für Messungen jedoch eine verhältnismäßig große Proteinmenge (2 - 500 µg Protein pro Experiment) ([Weber, Bujotzek et al. 2012](#)). Über eine systematische Vorgehensweise, bspw. durch die Verwendung von Nanopartikeln mit unterschiedlichen Valenzen und Größen oder über die Verwendung von unterschiedlichen Beschichtungsdichten, lassen sich Zusam-

menhänge zwischen der Zusammensetzung des Nanopartikels und der Bindungsaffinität oder -kinetik erstellen ([Hong, Leroueil et al. 2007](#), [Tassa, Duffner et al. 2010](#), [Munoz, Correa et al. 2013](#)).

Für die Identifikation neuer Liganden gegenüber einer gewünschten Zielstruktur oder sogar eines gewünschten Epitops sind ebenfalls zahlreiche Methoden beschrieben worden: Screening-verfahren mit chemischen Bibliotheken, Leitstruktureoptimierungen, molekulares Modellieren, Microarrays, Phagen-, Ribosomen-Display-, SELEX-Verfahren zur Gewinnung von Aptameren (engl. *Systemic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*), Immunisierung, uvm.

1.3.4 Mikroskalige Thermophorese

Bei der mikroskaligen Thermophorese (MST) handelt es sich um ein optisches Verfahren, bei dem die zeitliche Änderung des Fluoreszenzsignals eines Analyten durch Bindung an einen Liganden innerhalb eines Temperaturgradienten beobachtet wird ([Duhr and Braun 2006](#)). Die Ausrichtung von Partikeln in einem Temperaturgradienten wurde bereits im Jahre 1856 von Carl Ludwig beschrieben ([Ludwig 1856](#)). Diese Technologie hat sich bereits in zahlreichen Studien als sehr wertvoll zur Charakterisierung von Biomolekülen und deren Interaktion erwiesen ([Seidel, Dijkman et al. 2013](#), [Jerabek-Willemsen, André et al. 2014](#)). Neben kleineren Anwendungsgebieten, wie bspw. Fusions- oder Proteinfaltungsstudien, findet die MST hauptsächlich Anwendung bei der Bestimmung von Dissoziationskonstanten (K_D). Um einen Temperaturgradienten zu erzeugen, wird bei der MST ein Infrarotlaser eingesetzt (Abbildung 4). Die zeitliche Auflösung eines fluoreszierenden Moleküls in einem Konfokalkvolumen ermöglicht die Ermittlung der zeitlichen Diffusionsänderung.

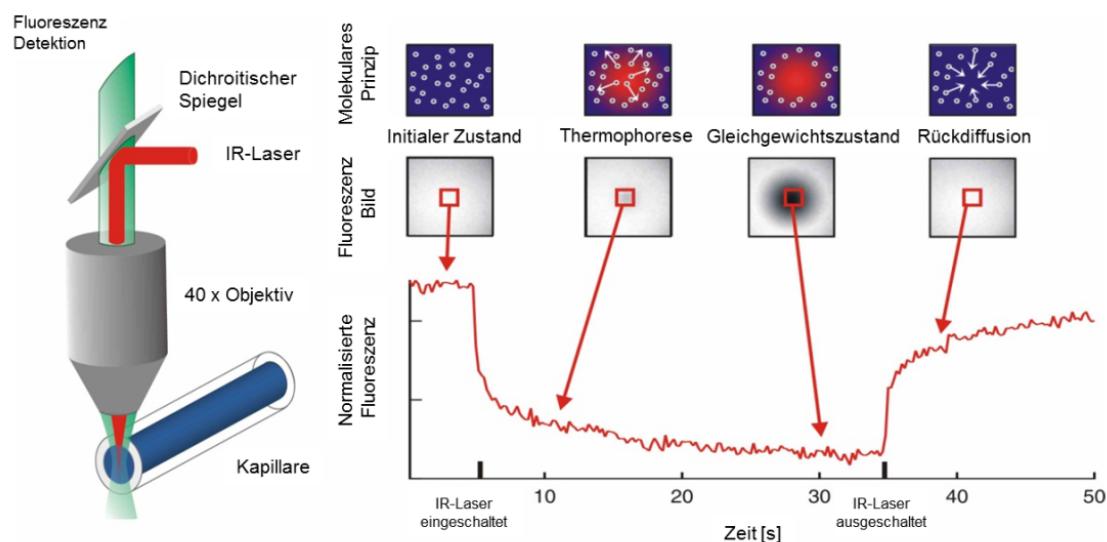


Abbildung 4: MST-Messapparatur und -Detektionsprinzip. Die zu untersuchenden Proben (5-10 μl) werden in eine Glasskapillare aufgenommen. Dabei bleibt die finale Konzentration des fluoreszenzmarkierten Analyten konstant. Das Anregungslicht wird über einen dichroitischen Spiegel und ein 40-fach Objektiv auf ein konfokales Volumen (1 nL) innerhalb der Flüssigkeit in der Kapillare fokussiert. Emittiertes Licht wird über einen Zeitraum von 40-50 Sekunden beobachtet. Die Messung kann in vier Abschnitte eingeteilt werden: I) Zu Beginn wird die initiale Fluoreszenz für 5 Sekunden aufgenommen. II) Durch Einschalten eines Infrarotlasers (IR) wird ein thermischer Gradient erzeugt, an dem Komplexe aus Analyt und Titrant entlang migrieren. III) Nach 30 Sekunden wird ein Gleichgewichtszustand erreicht. IV) Zu diesem Zeitpunkt wird der IR-Laser ausgeschaltet, wodurch die Moleküle zurückdiffundieren können. Dies äußert sich anhand eines Wiederanstiegs des Fluoreszenzsignals.

Die hierbei bestimmte Gesamtdiffusion setzt sich aus einer chemischen Diffusion (beschreibt den Konzentrationsausgleich in einer Lösung) und einer thermischen Diffusion (beschreibt das Migrationsverhalten entlang eines thermischen Gradienten) zusammen, die unterschiedliche vektorielle und zeitliche Beweglichkeitscharakteristiken aufweisen. Der Quotient aus thermischer und chemischer Diffusion wird über den Soret-Koeffizient (S_T) beschrieben ([Duhr and Braun 2006](#)). Zusammengesetzt erreichen die beiden Diffusionsformen in Gegenwart eines kontinuierlichen thermischen Gradienten eine Gleichgewichtssituation. In einer Verdünnungsreihe eines Liganden, der gegen einen Analyten mit konstanter Konzentration titriert wird, kann über die Änderung des thermophoretischen Verhaltens und der damit verbundenen Fluoreszenzänderung in der Gleichgewichtssituation eine Dissoziationskonstante bestimmt werden. Das thermophoretische Verhalten eines Analyten ist bei der MST abhängig von seiner Hydrathülle, welche sich bei der Bindung eines Liganden verändert. Dadurch kommt es zu einer Änderung der Hydrationsentropie (S_{hyd}) und der ionischen Abschirmung ([Duhr and Braun 2006](#)):

$$(3) \quad S_T = \frac{A}{kT} \left(-S_{hyd} + \frac{\beta \sigma_{eff}^2}{4\epsilon\epsilon_0 T} \lambda_{DH} \right)$$

Dabei steht A für die Moleküloberfläche, k für die Boltzmannkonstante, T für die Umgebungstemperatur, σ_{eff} für die effektive Ladungsdichte, ϵ für die Dielektrizitätskonstante und λ_{DH} für die Debye-Länge.

Im Bedarfsfall ist es auch durch wiederholtes Messen einer Titrationsreihe nach verschiedenen Zeitpunkten möglich, kinetische Informationen darüber zu erhalten, wie schnell sich ein Gleichgewicht einstellt. Eine Messung bei unterschiedlichen Temperaturen erlaubt darüber hinaus eine Auftrennung des freien Bindungsenthalpieterms in Terme für Entropie und Enthalpie ([Gaffarogullari, Krause et al. 2013](#)):

Für die *Gibbs*-Enthalpie (G) und die Dissoziationskonstante (K_D) gilt die Beziehung:

$$(4) \quad \Delta G = -RT \ln K_D$$

Durch Umstellung des Terms nach $\ln K_D$ und durch Einbeziehen der *Gibbs-Helmoltz*-Gleichung, lässt sich daraus die *Van't-Hoff*-Gleichung aufstellen:

$$(5) \quad \ln \frac{K_{D1}}{K_{D2}} = \frac{\Delta H}{R} \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right)$$

Für Multivalenzstudien können aus dieser Beziehung sehr wertvolle Erkenntnisse über die Beiträge von Enthalpie und Entropie bei der freien Gesamtbindungsenthalpie gewonnen werden.

Die MST erwies sich als nützlich bei der Charakterisierung von monovalenten und multivalenten Interaktionen, wie sich anhand einiger Beispiele zeigt: Bspw. konnte mit der MST die Bindungstöchiometrie eines DNA-Proteinkomplexes ([Jerabek-Willemsen, André et al. 2014](#)), Dissoziationskonstanten von multivalenten Nanopartikeln ([Bhatia, Lauster et al. 2017](#), [Lauster, Glanz et al. 2017](#)), Kooperativitätseffekte bei der Bindung von Ca^{2+} an Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) ([Seidel, Dijkman et al. 2013](#)) und eine Rezeptorspezifität von IAV-HA ([Ribeiro-Viana, Sanchez-Navarro et al. 2012](#)) bestimmt werden.

Bis *dato* existiert im Vergleich zur MST kein konkurrenzfähiges Messprinzip, über das bei ähnlich geringem Probenverbrauch (10 – 200 ng Protein pro Experiment) Informationen über Bindungsenthalpie und -entropie, Affinitäten oder Bindungstöchiometrien ermittelt werden können.

2. Ziele dieser Studie

Die vorliegende Arbeit besteht aus mehreren Teilprojekten, die gemeinsam darauf abzielen passförmige, multivalente Binder gegen die Influenza A Virusoberfläche bzw. Hämagglutinin-trimere zu generieren.

Zu diesem Zweck wurde als Modell das saisonale Grippevirus A/X31 (H3N2) verwendet. Im Rahmen dieser Arbeit wurden diverse monovalente und multivalente HA-Binder untersucht, um strukturelle Anforderungen eines multivalenten IAV-Binders zu identifizieren und um prinzipielle Fragestellungen in der Multivalenzforschung zu beantworten:

Im ersten Abschnitt werden folgende Fragen adressiert: Eignen sich Peptide aus der Paratopregion eines HA bindenden Antikörpers als antivirale Substanzen? Kann solch ein Peptid durch Austausch von Aminosäuren optimiert werden? Ist es möglich verschiedene IAV-Stämme mit diesem Peptid zu hemmen? Wie gut eignen sich Antikörperpeptide im Vergleich zu IAV bindenden Zuckern und Aptameren für eine Virusbindung und einer daraus resultierenden Bindungshemmung?

Im darauf folgenden Abschnitt wurden mittels SPR-Messungen Bindungskinetiken von Influenzaviren an 2D multivalente Oberflächen, die entweder mit α -2,6-SL, dem Antikörperpeptid PeB oder dem Aptamer A22 beschichtet wurden, aufgenommen. Dabei gilt es zu klären, ob sich neben dem natürlichen Rezeptor von HA auch andere Rezeptoren für eine multivalente Interaktion eignen. Darüber hinaus soll geklärt werden, ob sich Unterschiede in der Bindungskinetik bei der Wechselwirkung von IAV mit Oberflächen, die verschiedene monovalente Rezeptoren tragen, ergeben.

Im Hauptteil der vorliegenden Arbeit wurden zwei Rezeptorpräsentationsvarianten gewählt, bei denen Rezeptoren entweder statistisch bzw. ungeordnet verteilt vorliegen oder bei denen die Rezeptoren definiert bzw. organisiert gegenüber der IAV-Oberfläche ausgerichtet sind. Für beide Varianten wurden entsprechende Gerüstsysteme verwendet, die dies ermöglichen. Für eine statistische Rezeptorpräsentation von SA wurden lineare und zwei verschieden große, dendritische Polyglycerole als Trägersysteme herangezogen. Hierbei wurden folgende Fragen adressiert: Gibt es eine optimale SA-Rezeptordichte durch den Vergleich von Polyglycerolsialosiden (PGSA) mit unterschiedlichem Funktionalisierungsgrad (FG)? Ist der optimale FG für lineare und dendritische PGSA gleich? Unterscheiden sich verschiedene Gerüstformen in ihrem antiviralen Potential? Welche Rolle spielt die Polymergröße bei der Inhibition von IAV?

Im darauf folgenden Abschnitt wurden Peptid-Polyglycerolkonjugate untersucht. Analog zu den PGSA wurden hier die Antikörperpeptide PeB und PeB^{GF} auf verschieden großen dendritischen Polyglycerolen und mit unterschiedlichem FG immobilisiert. Mit dieser Serie an multivalenten

Nanopartikeln galt es folgende Fragen zu beantworten: Eignen sich die Antikörperpeptide in Kombination mit Polyglycerolen als IAV-Inhibitoren? Lässt sich ein Unterschied zwischen einer multivalenten Präsentation von PeB und PeB^{GF} erkennen? Welche Rolle spielt der FG bei der Bindung und Inhibition an IAV? Wie hoch ist der Verstärkungsfaktor im Vergleich zu Messungen mit den monovalenten Peptiden und im Vergleich zu PGSA?

Den statistischen Rezeptor-Polymersystemen gegenüberstellend wurden PNA-DNA-Heteroduplexe und Q β -Phagenkapside als Gerüstsysteme herangezogen. Diese ermöglichen eine räumlich definierte Ausrichtung von Sialosiden auf den Biopolymergerüsten. Dabei eignete sich jedes der beiden Gerüstsysteme für die Beantwortung spezifischer Fragestellungen.

Durch die Verwendung von starren PNA-DNA-Gerüsten, die eine bivalente Rezeptorpräsentation ermöglichen soll folgendes geklärt werden: Gibt es einen optimalen bivalenten Rezeptorabstand bei der Bindung an HA? Wenn dies zutrifft, lässt sich auch mit bivalenten flexiblen PEG-basierten Bindern eine Abstands-Affinitätsbeziehung ausmachen? Ermöglicht eine starre Rezeptorpräsentation eine höhere Affinität als eine flexible Präsentation? Können mit einem optimalen Rezeptorabstand verschiedene IAV-Stämme gebunden werden? Kann durch eine multiple Präsentation von starren bivalenten Rezeptorclustern auf PolyDNA eine höhere Bindungsinhibition erzielt werden?

Zu einem ähnlichen Zweck, jedoch mit dem Ziel eine optimale, trivalente Interaktion an HA-Trimere zu ermöglichen, wurden Q β -Phagenkapside in die vorliegende Studie miteinbezogen. Q β -Phagenkapside sind starre Proteingerüste, über die an spezifischen Aminosäurepositionen eine räumlich definierte Rezeptordarstellung bewerkstelligt werden kann. Durch die Immobilisierung von SA mit unterschiedlich langen Ethylenglycol (EG) Linkern an definierte Positionen auf dem Proteingerüst können verschiedene Rezeptorabstände generiert werden. Mit diesem Multivalenzmodell wurden folgende Fragen geklärt: Gibt es einen optimalen, trivalenten Rezeptorabstand und wie groß ist er? Wie unterscheiden sich Q β -Phagenkapside, die SA über kurze oder längere EG-Linker präsentieren, in ihrer Affinität gegenüber IAV? Falls eine Korrelation zwischen Rezeptorabstand und Bindung an IAV identifiziert werden kann, ist diese auch für andere IAV-Stämme gültig? Kann über eine Darstellung von α -2,6-SL- oder α -2,3-SL-Rezeptoren auf den Phagenkapsiden eine Serospezifität gegenüber verschiedenen IAV-Stämmen erzielt werden?

Zuletzt wurden A/Panama (H3N2) Viren, die in Zellkulturpräparationen in sphärischer und filamentöser Form gewonnen werden, nach Morphologie separiert und in ihrem Bindungspotential gegenüber multivalenten Oberflächen untersucht. Dabei war von Interesse, ob es prinzipiell möglich ist, A/Panama (H3N2) Viren nach ihrer Form zu trennen und ob es Unterschiede zwischen sphärischen und filamentösen Viren bei der Interaktion mit multivalenten Oberflächen gibt.

3. Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Laborgeräte

Tabelle 1: Verwendete Laborgeräte.

Laborgerät	Hersteller
Thermo HAAKE DC10-P14 Wärmebad	Thermo Scientific
Herasafe KS 9 Sicherheitswerkbank	Thermo Scientific
Galaxy 170 S CO ₂ Inkubator	New Brunswick
Eppendorf Research plus, Einkanal-Pipetten (Modelle: 0,1 – 2,5 µl; 0,5 – 10 µl, 2 – 20 µl, 10 – 100 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)	Eppendorf
Eppendorf Research plus, 8-Kanal Pipette (Modell: 10 - 100 µl)	Eppendorf
MS 1 Minishaker, Vortexer	IKA
Rocker 2D basic, Schüttler	IKA
Heraeus Biofuge Stratos Zentrifuge	Thermo Scientific
Arpege 70 Airliquid, Flüssigstickstoffbehälter	Air liquid
Optima L-100K Ultrazentrifuge	Beckman Coulter
Ultrazentrifugen-Rotoren: Ti45, Ti70, SW40	Beckman Coulter
Sonorex Super Digital Ultraschallbad	Bandelin
HERAfreeze HFU 486 Basic, Gefrierschrank	Thermo Scientific
Premium GNP 4166, Gefrierschrank	Liebherr
IQ 300, Kühlschrank	Siemens
Milli-Q Integral Wasseraufbereitungsanlage	Millipore
Geldokumentationssystem Felix 1040	Biostep
Geldokumentationssystem Desaga	Sarstedt
Sprout Minizentrifuge	Kisker
ThermoMixer C	Eppendorf
Laborwaage CPA 323 S	Sartorius
Laborwaage micro	Sartorius
Nanodrop 2000	Thermo Scientific
Ultrafeinwaage „basic“	Sartorius
Labor-pH-Meter 766 und 761	KNICK
Biacore T100	GE-Healthcare, Bio-Sciences AB
Monolith NT.115 (Grün/Rot LED)	Nanotemper
Spark Plattenleser	Tecan
FLUORstar Plattenleser	Optima
Gradientmaster	BioComp Instruments, Inc.
Econo Chromatographie-System (mit Peristaltikpumpe und UV-Monitor)	Bio-Rad

3.1.2 Labormaterialien

Tabelle 2: Verwendete Labormaterialien.

Labormaterialien	Hersteller
Glasflaschen (50, 100, 500, 1000 ml)	DURAN
Messzylinder (50, 100, 500, 1000 ml)	VITLAB
Messkolben (50, 100, 500, 1000 ml)	DURAN
Glasbecher (100,500, 1000, 2000 ml)	DURAN
Reagenzreservoir (steril)	Starlab
Zellkulturflaschen (T25, T75, T150)	Nunc
Cellmaster Rollerflaschen (kurze Form, gewellter Boden, 2125 cm ² Wachstumsfläche)	Greiner Bio-One
Zentrifugenröhrchen (15, 50 ml)	Thermo Fisher Scientific
Pippettenspitzen (10, 200, 1000 µl)	Starlab
Dialysekassetten	Thermo Fisher Scientific
Minigrößenaufreinigungssäule G25	GE Healthcare
Standard Glaskapillaren (Monolith NT.115)	Nanotemper

3.1.3 Chemikalien, Lösungen und biologisches Material

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien.

Chemikalie	Hersteller
Avicel	Sigma Aldrich
Aceton	Carl Roth
Acetat	Carl Roth
2-Mercaptoethanol	Roth
BSA	Sigma Aldrich
Citrat	Carl Roth
Trockenmilch	Carl Roth
DAPI	Thermo Fisher Scientific
DMSO	Carl Roth
DTT	Sigma
Ethanol (100 %)	Merck
Ethanol (96 %, vergällt)	Carl Roth
EDC	Sigma Aldrich
EDTA	Serva
Glycerol	Roth
HCl 32 %	Merck
Helipur	B.Braun
Hepes	AppliChem
D-Galactose	Carl Roth
D(+)-Biotin	AppliChem
L-Glutamin	Biomol
L-Glycin	Biomol
MgCl ₂	Carl Roth
Meliseptol	B.Braun
NaN ₃	Carl Roth

NaOH	Merck
NaHCO ₃	Merck
Natriumchlorid	Roth
NHS	Sigma Aldrich
OPD Tabletten	Thermo Fisher Scientific
PFA	Fluka
Poly-L-Lysin	Thermo Fisher Scientific
R18	Thermo Fisher Scientific
Ricin-Agarose	Lectinity
RNase AWAY	Molecular BioProducts
RNasin	Promega
Saccharose	AppliChem
TPCK-Trypsin	Sigma Aldrich
Tris Base	AppliChem
Triton X-100	Roth
Tween 20	Merck

Tabelle 4: Verwendete Puffer. Alle Puffer wurden mit Reinstwasser aus einer Wasseraufbereitungsanlage (MilliQ, Millipore) hergestellt. Für optische und chromatographische Verfahren wurden alle Puffer steril filtriert und entgast. Alle Puffer wurden bei 4-8°C gelagert. EDTA haltige Puffer wurden in Plastikflaschen aufbewahrt.

Puffer	Zusammensetzung (1x)	Quelle
Acetat-Puffer (Fusionspuffer)	150 mM NaCl, 10 mM Natriumacetat, pH 6,5	Eigenherstellung
Citrat-Puffer	0,05 M Phosphat-Citrat; 0,03 % (w/v) Natriumperborat, pH 5	Eigenherstellung
DPBS	2,67 mM KCl; 1,47 mM KH ₂ PO ₄ ; 137,93 mM NaCl; 8,06 mM Na ₂ HPO ₄ X 7 H ₂ O; ohne Mg ²⁺ /Ca ²⁺	PAN-Biotech
DPBS ^{+/+}	2,67 mM KCl; 1,47 mM KH ₂ PO ₄ ; 137,93 mM NaCl; 8,06 mM Na ₂ HPO ₄ X 7 H ₂ O; 0,49 mM Mg ²⁺ ; 0,9 mM Ca ²⁺	PAN-Biotech
Fixierpuffer	4 % Paraformaldehyd in DPBS ^{+/+}	Eigenherstellung
Permeabilisierungspuffer	0,5 % (w/v) Triton X-100; DPBS ^{+/+}	Eigenherstellung
Blockierpuffer	3 % (w/v) BSA; 100 mM L-Glycin	Eigenherstellung
Antikörperverdünnungspuffer I	1 % (w/v) BSA; 0,02 % (w/v) NaN ₃ in DPBS ^{+/+}	Eigenherstellung

Antikörper- verdünnungspuffer II	0,3 % (v/v) Tween 20; 5 % (w/v) Trockenmilch in DPBS ^{+/+}	Eigenherstellung
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA	Eigenherstellung
TNE-Puffer	10 mM Tris-HCl; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; pH 7,4	Eigenherstellung
HBSP	10 mM HEPES, 150 mM NaCl; 0,05 % Tween 20; pH 7,4	Eigenherstellung
Waschpuffer	0,3 % (v/v) Tween 20 in DPBS ^{+/+}	Eigenherstellung

Tabelle 5: Verwendete Medien.

Bezeichnung	Zusammensetzung	Hersteller
Vollmedium	DMEM mit 4,5 g/l Glucose; 3,7 g/l NaHCO ₃ ; Phenolrot; <u>Zusätze</u> : 2 mM L-Glutamin; 10 % (v/v) FBS; 100 U/ml Penicillin; 100 µg Streptomycin/ml	PAN-Biotech
Plaquetest-Medium	2,5 % (w/v) Avicel [®] ; 1 % (w/v) DEAE-Dextran; 0,05 % (w/v) NaHCO ₃ ; 0,4 % BSA (w/v) in 2x MEM	Eigenherstellung
Zellgefriermedium	70 % (v/v) Vollmedium; 20 % (v/v) FBS; 10 % (v/v) DMSO	Eigenherstellung
Infektionsmedium I	Vollmedium; Variante mit 0,2 % (v/v) FBS; 0,2 % (v/v) BSA	Eigenherstellung
Infektionsmedium II	Vollmedium; Variante mit 0,1 % (v/v) FBS; 0,1 % (v/v) BSA	Eigenherstellung

Tabelle 6: Verwendete Kits.

Produkt	Hersteller
CellTiter 96 [®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS)	Promega
CellTiter-Glo [®] Luminescent Cell Viability Assay	Promega
Pierce [™] BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific

Tabelle 7: Verwendete Viren.

Virus	Anzucht
A/X31/1 (A/Aichi/1968 (H3N2) reassortiert mit A/Puerto Rico /8/1934 (H1N1))	Hühnerei Allantois Flüssigkeit*
A/Panama/2007/1999 (H3N2)	MDCK-II Zellüberstand*
A/mallard/Germany/439/2004 (H3N2)	Hühnerei Allantois Flüssigkeit*
A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1)	Hühnerei Allantois Flüssigkeit*
A/WSN/1933 (H1N1)	MDCK-II Zellüberstand*
A/teal/Germany/2005 (H5N1) (x A/WSN/1933)	MDCK-II Zellüberstand**
A/mute swan/Rostock/R901/2006 (H7N1 LP)	MDCK-II Zellüberstand*
B/Thüringen/02/2006	Vero E6 Zellüberstand***

*Eigenanzucht. **Dr. Carolin Mair (HU Berlin), *** PD Dr. Thorsten Wolff (RKI, Berlin)

Tabelle 8: Verwendete Antikörper.

Antikörper	Ursprungsorganismus	Modifikationen	Hersteller
Anti-NP ^{IAV} (m)	Maus	FITC	Millipore
Anti-NP ^{IAV} (m)	Maus	keine	Millipore
Anti-Maus (p)	Ziege	Alexa488	KPL
Anti-Maus (p)	Ziege	HRP	KPL

m= monoklonal, p= polyklonal

Tabelle 9: Verwendete Software.

Software	Hersteller
FV10-ASW 4.2	Olympus
GIMP 2.8.16	The GIMP Team
FlowJo 10.3.0	FlowJo LLC
Desaga	Sarstedt
ArgusX1 7.14.22	Biostep
Affinity Analysis v2.0	Nanotemper
Office 2010 Packet Produkte	Microsoft
GraphPad 6	Prism
Image J 1.49d	NIH, USA
Chimera 1.11.2	UCSF, USA
Biacore Evaluation Software 1.1	GE Healthcare

3.1.4 Arbeit mit Oligonukleotid Aptameren

Die für diese Studie verwendeten Peptide wurden von Microsynth synthetisiert, mittels PAGE aufgereinigt und in lyophilisierter Form bereitgestellt. Erhaltene Aptamere wurden in RNase freiem Wasser gelöst und bei -80°C gelagert. Vor der Verwendung der Aptamere in Experimenten wurden diese für 5 min bei 65°C erhitzt, um Sekundärstrukturen aufzulösen und anschließend schrittweise auf RT abgekühlt, um die denaturierte Form zu konservieren. Jegliche Arbeit mit RNA Aptameren wurde in Gegenwart von RNasin 0,5 U/µl durchgeführt. Außerdem wur-

den Oberflächen, Pipetten und Handschuhe mit RNase AWAY zur Inaktivierung von RNAsen behandelt und es wurde mit Filterpipettenspitzen gearbeitet.

Tabelle 10: Verwendete Oligonukleotid Aptamere.

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'	M (kg/mol)	Referenz
A22	AATTAACCCTCACTAAAGGGCT GAGTCTCAAAACCGCAATACAC TGGTTGTATGGTCGAATAAGTTAA	20,95	Jeon, <i>et al.</i> 2004
NP ^{IAV} (147-158, Kontrolle)	ACTTATCAGCGGACCCGTGCCTTT GTTCGTACTGGTGAT	12,27	Jeon, <i>et al.</i> 2004
A22-Biotin	Biotin-AATTAACCCTCACTAAAGGG TGAGTCTCAAAACCGCAATACAC TGGTTGTATGGTCGAATAAGTTAA	21,36	Cui, <i>et al.</i> 2011
P30-10-16	GGGUUAGCAGUCGGCAUGCGGUA CAGACAGACCC	10,45	Gopinath, <i>et al.</i> 2006
P30-10-16 (19C-A, Kontrolle)	GGGUUAGCAGUCGGCAUG <u>A</u> GGUAC AGACAGACCC	10,45	Gopinath, <i>et al.</i> 2006

3.1.5 Arbeit mit Peptiden

Die für diese Studie verwendeten Peptide (Tabelle 3) wurden von Rudolf Volkmer (Charité, Berlin) in lyophilisierter Form bereitgestellt. Das biotinylierte Peptid PeB wurde von Biosynthan synthetisiert. Für die Herstellung wurde eine Fmoc Festphasenpeptidsynthese angewendet. Der C-Terminus lag als Carboxamid vor. Alle Peptide wurden mittels HPLC aufgereinigt und analysiert (A: 0,05 % (w/v) TFA in Wasser; B: 0,05 % (w/v) TFA in Acetonitril; Gradient: 5-60 % (B) für 30 min; UV-Detektor bei 214 nm; RP-18 Säule). Die aufgereinigten Peptide wurden mittels MALDI-TOF (microflex LT, Bruker Daltonik) und ESI (Q-TOF micro, Micromass) zur Identifikation analysiert. Lyophilisierte Peptide konnten bis zu einem Jahr bei -20°C gelagert werden, wie HPLC/MS Analysen ergaben. Peptidlösungen wurden auf Basis ihres Molekulargewichts unter Berücksichtigung von TFA-Salzrückständen aus der Aufreinigung eingewogen und in DPBS gelöst. 8 mM Stammlösungen der Peptide (PeB, PeB^{GF} und PeB^P) wurde 10 % (v/v) DMSO zur Verbesserung der Löslichkeit zugesetzt und sie wurden einer kurzen Ultraschallbehandlung unterzogen. Peptidstammlösungen waren für mehrere Wochen bei 4-8 °C stabil.

Tabelle 11: Verwendete Peptide.

Bezeichnung	Sequenz N → C	M (g/mol) ⁱⁱ	Referenz
S2(1-15)	ARLPRTMVHPNGAQP	2100	Matsubara, Onishi <i>et al.</i> 2010
s2(1-8)	ARLPRTMV	1285	Matsubara, Onishi <i>et al.</i> 2010
s2(1-8)-Biotin	ARLPRTMV-Biotin	1781	Matsubara, Onishi <i>et al.</i> 2010
s2(r1-8)	VMTRPLRA	1285	Matsubara, Onishi <i>et al.</i> 2010
Mucroporin-M1	LFRLIKSLIKRLVSAFK	2715	Li, Zhao <i>et al.</i> 2011
L-P1	HAWDPIPARDPF	1763	Wu, Li <i>et al.</i> 2011
EB	RRKKAVALLPVLLALLAP	2653	Jones, Turbin <i>et al.</i> 2006
P1	NDFRSKT	1094	Rajik, Omar <i>et al.</i> 2009
PeB	ARDFYDYDVFFYYAMD	2182	Memczak, Lauster <i>et al.</i> 2016
Lys-PeB	KKKK- ARDFYDYDVFFYYAMD	1572	Memczak, Lauster <i>et al.</i> 2016
PeB ^{GF}	ARDFYGYDVFFYYAMD	2108	Memczak, Lauster <i>et al.</i> 2016
PeB ^P	ARDFYDPDVFFYYAMD	2116	Memczak, Lauster <i>et al.</i> 2016

3.1.6 Arbeit mit Kohlenhydraten

Sämtliche in dieser Studie verwendeten Kohlenhydrate wurden in kristalliner Form bei 4-8°C gelagert. Für die Herstellung von Stammlösungen wurde die gewünschte Menge eingewogen, in DPBS gelöst und bei -20°C gelagert.

Tabelle 12: Verwendete Kohlenhydrate.

Bezeichnung	M (g/mol)	Quelle
α-2,6-Sialyllactose	655,53	Carbosynth
α-2,3-Sialyllactose	655,53	Carbosynth
α-2,6-Sialyllactose-Biotin	1009,02	Lectinity
α-2,6-Sialyl-N-acetyllactosamine	674,60	Victor Bandlow (AG Seitz)

ⁱⁱ Molekulargewichte aus den Aminosäuresequenzen unter Berücksichtigung von TFA aus dem finalen Fällungsschritt der Peptidaufreinigung. Pro Arginin- (R), Histidin- (H), Lysinrest (K) in der Aminosäuresequenz und je Aminoterminus wurden 114,02 g/mol zu dem Molekulargewicht des Peptids addiert.

3.2 Methoden

3.2.1 Arbeit mit Labortieren

Die Anzucht von Influenzaviren in Hühnerembryonen, sowie das experimentelle Arbeiten mit Labormäusen wurde entsprechend der Tierschutzverordnung des Landesgesundheitsamtes Berlin durchgeführt. Sämtliche Experimente mit Labormäusen wurden nach schriftlichem Antrag durch das LAGeSo genehmigt (TierSchG § 1). Labormäuse wurden von fachkundigem Personal unter artgerechten Bedingungen in Gruppen zu je 5 Mäusen pro Tierkäfig gehalten (TierSchG § 1). Der Zugang zu Futter und Wasser war je nach Belieben gewährleistet. Die Tiere wurden in einem klimatisierten Raum gehalten und täglich inspiziert. Labormäuse wurden beim Beenden eines Experiments durch zervikale Dislokation getötet (TierSchG § 2). Hühnerembryonen wurden vor der Virusernte durch Einfrieren getötet.

3.2.2 Kultivierung von Zellen

Arbeiten mit Zellkultur wurden unter sterilen Bedingungen an einer Sterilbank bei Raumtemperatur in einem dafür vorgesehenen S2 Labor durchgeführt. Für diese Arbeit wurden eine immortalisierte adhärente Hundenierenepithelzelllinie (MDCK-II, NBL-2, CCL-34, American Type Culture Collection (ATCC)) und eine humane Lungenadenokarzinomzelllinie (A549, CCL-185, Cell Lines Service (CLS)) verwendet. Alle Zelllinien wurden mittels PCR negativ auf Mykoplasmen getestet. Die genannten Zelllinien wurden unter physiologischen Standardbedingungen in Vollmedium DMEM (Tabelle 4) in der Umgebung von 37 °C, 5 % (v/v) CO₂, befeuchteter Luft und bei Standardluftdruck (101,325 kPa) kultiviert. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit einer für die Zellkultur beschichteten Wachstumsfläche von 25 cm², 75 cm² oder 150 cm² kultiviert. Beim Erreichen einer Konfluenz von 80-90 % wurden die Zellen mit DPBS gespült, mit Trypsinlösung inkubiert bis sich die Zellen vom Flaschenboden ablösen, dann in Vollmedium resuspendiert und bei 300 x g pelletiert. Das Pellet wurde wieder in einem gewünschten Medium aufgenommen und entsprechend verdünnt. Zellen wurden nicht länger als 20 Passagen kultiviert.

3.2.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zellen, die nach der Trypsinierung mit Medium gewaschen wurden, wurden in Gefriermedium (70 % (v/v) Vollmedium, 20 % (v/v) FCS und 10 % (v/v) DMSO) resuspendiert und in Kryogefäßen mit Schraubverschluss für 24 h bei -80 °C gelagert, bevor sie in einen Flüssigstickstofftank (-196 °C) überführt wurden. Gefrorene Zellen wurden zügig bei 37 °C aufgetaut und nach einem Waschschrift in Vollmedium in eine Zellkulturflasche überführt.

3.2.4 Zählen von Zellen

Abgelöste und gewaschene Zellen wurden durch wiederholtes Resuspendieren vereinzelt, ca. 20 µl in eine Neubauerzählkammer überführt und manuell ausgezählt. Die Zellzahl (N) pro Volumen errechnete sich wie folgt:

$$(6) \quad N = \bar{x} * d * 10^4$$

wobei \bar{x} dem Mittelwert von vier unabhängigen Zählungen und d dem Verdünnungsfaktor entspricht.

3.2.5 Arbeit mit Viren

Jegliche Arbeit mit Viren wurde unter dafür vorgesehenen Sicherheitsbedingungen durchgeführt. Der Transfer von Viren an externe Messapparaturen wurde erst nach UV-Inaktivierung des viralen Genoms (5 min, 220 nm auf Eis (0 °C)) durchgeführt. Zur Überprüfung, ob virale Oberflächenproteine dabei funktionsfähig blieben, wurde ein Hämagglutinationstest durchgeführt.

3.2.6 Viruszucht und Lagerung

Influenzaviren des Typs A/X31 (HA und NA von A/Aichi/2/68 (H3N2), reassortiert mit Genomsegmenten aus A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) zur Vervollständigung des Genoms), A/mallard/Germany/439/2004 (H3N2) und A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) wurden standardmäßig in Eiern mit 10 Tage alten Hühnerembryonen gezüchtet. Hierbei wurden befruchtete und bebrütete Eier (VALO BioMedia GmbH) mit 100 µl antibiotika- (100 µg/ml Streptomycin und 100 U/ml Penicillin) und virushaltiger Allantoisflüssigkeit (10-50 HAU / ml) infiziert und die Injektionsstelle mit Paraffin versiegelt. Nach einer weiteren Inkubation für 2-3 Tage bei (35°C) wurde Allantoisflüssigkeit aus dem Allantoissack des Embryos entnommen und gesammelt. Die geerntete Flüssigkeit wurde durch einen Zentrifugationsschritt (10 min, 300 x g) von Zellschrott getrennt. An dieser Stelle konnte je nach Bedarf ein portionierter Gefriervorrat angelegt werden, oder die Viren wurden weiter aufkonzentriert. Hierbei wurde die virushaltige Lösung zentrifugiert (100,000 x g, 1 h, 4 °C) und das Viruspellet in TNE Puffer vorsichtig unter kontinuierlichem Rühren über Nacht bei 4 °C resuspendiert.

Die Influenzastämme A/Panama/2007/1999 (H3N2) und gering pathogenes (engl. *low pathogenic*, LP) A/mute swan/Rostock/R901/2006 (H7N1 LP) wurden auf MDCK-II Zellen je nach Mengenbedarf in 2125 cm² Rollerflaschen mit gewelltem Boden oder 175 cm² Kulturflaschen gezüchtet und analog zu den A/X31 (H3N2) Viren weiterverarbeitet.

Alle Viren wurden bei -80 °C portionsweise gelagert. Um Gefrierschäden und den damit verbundenen Verlust an Virustiter zu minimieren, wurden aufgetaute Virusproben nur einmal für Infektionstests verwendet.

3.2.7 Virustitration

Influenzaviren wurden mittels verschiedener Verfahren quantifiziert: Proteinbestimmung, TCID₅₀, Plaquetest oder HA Titration.

Für die Bestimmung des TCID₅₀-Titers wurden zunächst 30.000 Zellen pro Schacht einer 96-Mikroschachtplatte ausgesät. Da Influenzaviren mittels Hämagglutination detektiert werden können, wurden für die Titration virushaltiger Lösungen MDCK-II Zellen in U-förmigen Mikroschachtplatten ausgesät. Am folgenden Tag wurde die zu titrierende virushaltige Lösung zunächst 1:100 in Infektionsmedium I vorverdünnt und je 111 µl davon in alle acht Schächte von Spalte 6 und 7 der Mikroschachtplatte überführt. Mit einer Multipipette wurden 11 µl in lateraler Richtung sukzessiv in 100 µl Infektionsmedium I verdünnt (1:10). Gegebenenfalls wurde für eine Feintitration mit halben Logstufen verdünnt (46 µl auf 100 µl). Nach jedem Verdünnungsschritt wurden die Pipettenspitzen gewechselt. Danach wurde die Platte für 3-4 Tage bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Platten je nach Virustyp ausgelesen. In solche Platten, die mit Influenzaviren infiziert wurden, konnte direkt 50 µl 1 % (v/v) Erythrozytenlösungⁱⁱⁱ pro Schacht auf das Medium gegeben werden. Nach einer Stunde bei RT zeigten virushaltige Schächte eine Hämagglutination, während sich in Schächten ohne Virus am Grund der Platte ein Blutpellet bildete. Die Platten wurden manuell ausgelesen und mittels der Spearman-Kärber-Methode ausgewertet.

Für die Einstellung des MOI wurde der TCID₅₀-Wert in Plaque bildende Einheiten (engl. *plaque forming units*, kurz: pfu) überführt. Hierbei entspricht 1 TCID₅₀/ml ungefähr 0,69 pfu/ml nach folgender Umrechnung:

$$(7) \quad P_0 = e^{-m} = 0,5$$

$$(8) \quad m = -\ln(0,5) = 0,69$$

wobei P_0 dem Anteil an negativen Proben aus dem TCID₅₀ und m dem Mittelwert der Infektionseinheiten pro Volumen (pfu/ml) entspricht.

Alternativ wurde ein Plaquetest durchgeführt. Hier wurden in einem 6-Schacht Format 1×10^6 Zellen ausgesät. Am nächsten Tag wurden die zu titrierende Viruslösung zunächst 1:100 verdünnt, diese Vorverdünnung dann schrittweise 5-mal in verschiedenen Reaktionsgefäßen 1:10

ⁱⁱⁱ Für humanpathogene Viren wurde humanes Erythrozytenkonzentrat verwendet (DRK Berlin). Für aviäre Stämme wurde Truthahn- oder Hühnerblut verwendet (Veterinärmedizin, FU Berlin oder RKI Berlin).

verdünnt. Je 1 ml jeder Verdünnung wurden dann pro Schacht auf die Zellen transferiert und die Platte wurde 1 h bei 37 °C zur Infektion inkubiert. Danach wurde der Überstand entfernt, die Zellen mit DPBS⁺⁺ gewaschen und mit Plaquetest-Medium (siehe Tabelle 4) überschichtet. Durch Viren verursachte Plaques erschienen farblos und wurden für jede Verdünnung, unter Berücksichtigung der Vorverdünnung, zur Titerbestimmung ausgezählt.

Da Influenzaviren die Fähigkeit zur Hämagglutination besitzen, konnte auch eine Titration auf Basis der Hämagglutinininkonzentration durchgeführt werden. Hierbei wurden die Viren in einer U-förmigen 96-Schachtplatte schrittweise 2-fach in DPBS verdünnt. Anschließend wurden 50 µl einer 1 % (v/v) Erythrozytenlösung² ($\sim 2 \cdot 10^6$ Zellen/µl) zugegeben und die Platte wurde bei RT für 1 h inkubiert. Der letzte Schacht, der noch Hämagglutination aufwies, wurde als Endpunkt für die Titerbestimmung verwendet. Der Verdünnungsfaktor pro eingesetztes Volumen wurde als HAU/µl ausgedrückt.

Alle Titrationen wurden im Duplikat durchgeführt und der Mittelwert führte zu dem finalen Virustiter. Gezüchtete, aliquotierte Viren wurden vor der Titration einmal eingefroren, sodass der Titer aufgetauter Viren für Experimente dem aus der Titration entsprach.

3.2.8 Aufreinigung von Influenzaviren

Hierfür wurde Viruskonzentrat (siehe 3.2.6) über einen kontinuierlichen 20-60 % (w/v) Saccharosegradienten in TNE Puffer aufgereinigt. Der Gradient wurde automatisiert mittels eines „Gradientmasters“ (BioComp Instruments, Inc.) bei RT hergestellt. Auf den Gradienten wurden 500 µl Viruskonzentrat gegeben und für 2 h bei 4 °C und 100.000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde über Nacht unter leichtem Schütteln in TNE-Puffer eingeweicht und am nächsten Tag vorsichtig resuspendiert. Danach wurde die Viruslösung einmal für 2 h und einmal über Nacht bei 4 °C gegen DPBS mittels einer Dialysekassette mit 10 kDa Porengröße dialysiert. Aufgereinigte Viren wurden zur Konservierung mit 0,02 % (w/v) NaN₃ versetzt und im Kühlschrank aufbewahrt. Die Viren wurden mit Kryo-TEM untersucht, um die Präsenz von vollständig intakten Viren sicherzustellen.

3.2.9 Proteinquantifizierung

Für die Quantifizierung von Virus und viralen Proteinbestandteilen wurde ein BCA Protein Assay Kit verwendet. Dieser Test stellt ein kolorimetrisches Messverfahren dar, bei dem in Gegenwart von Peptidbindungen und insbesondere gegenüber den vier Aminosäuren Cystein, Cystin, Tryptophan und Tyrosin ein violetter Farbumschlag auftritt ([Wiechelman, Braun et al. 1988](#)). In einer Biuret-Reaktion reduzieren Proteine Cu²⁺ zu Cu¹⁺ Ionen in alkalischem Milieu. Bei der Proteinbestimmung von intakten umhüllten Viruspartikeln wird aufgrund der Membranimpermeabilität von Ionen lediglich die Konzentration an Oberflächenproteinen detektiert. Eine

Kalibrierungsgerade wurde durch eine Verdünnungsreihe an Rinderserumalbumin erstellt und eine Pufferkontrolle zur Ermittlung der Hintergrundabsorption verwendet. Die Detektionslösung wurde durch eine 50:1 Mischung von Lösung A und B vorbereitet. Davon wurden jeder zu untersuchenden Proteinlösung 200 µl zugesetzt und die Mixtur bei 37°C für 30 min inkubiert. Im Anschluss daran wurde die Platte auf RT temperiert und die Absorption der Lösungen bei 560 nm gemessen. Nach Abzug der Messwerte für die Pufferkontrolle von den Probenmesswerten, wurde über die Geradenfunktion der Kalibrierungsgerade die Proteinkonzentration der zu untersuchenden Probenlösungen ermittelt.

3.2.10 Aufreinigung und Fluoreszenzmarkierung von Influenza Hämagglutinin

Für die Darstellung von löslichem HA wurden aufgereinigte A/X31 (H3N2) Influenzaviren verwendet (siehe 3.2.8). Zunächst wurden 10 mg Bromelain in 1 ml TE Puffer mit 2-Mercaptoethanol (50 mM) gelöst und mit demselben Volumen Influenzavirus (5 mg/ml) in TE-Puffer gemischt und über Nacht bei 37 °C verdaut. Anschließend wurde der Verdau durch Ultrazentrifugation (100.000 x g, 1 h, 4 °C) fraktioniert. Der Überstand, der vereinzelte Bromelain-verdaute HA-Trimere (bHA) enthielt, wurde abgenommen und weiter über eine lektinbasierte Affinitätschromatographie wie folgt aufgereinigt.

Alle Aufreinigungsschritte wurden bei Raumtemperatur und mit Hilfe eines Pump- und UV-Monitor gestützten Chromatographiesystems (Laufgeschwindigkeit, Econo, Bio-Rad) durchgeführt. Für die Aufreinigung wurde eine Säule mit 2 ml Säulenvolumen eines Ricin-Agarose Konjugats herangezogen. Diese wurde zunächst mit DPBS gespült, bis sich eine Grundlinie am UV-Monitor einstellte. Dann wurden 2 ml aus dem Virusverdau auf die Säule gegeben und für 1 h im Säulenmaterial inkubiert. Danach wurde die Säule mehrfach gespült, bis sich wieder eine Grundlinie am UV-Monitor eingestellt hatte. Gebundenes bHA wurde mit 2 ml D-Galactose (50 mM) eluiert, wobei proteinhaltige Fraktionen mittels des UV-Monitors detektiert und vereinigt wurden. Bei Bedarf wurde die Proteinlösung weiter mit einem 30 kDa Abtrennfilter konzentriert und mit einer Dialysekassette mit 10 kDa Porengröße gegen DPBS dialysiert. Eine Reinheits- und Aktivitätskontrolle wurde mit einer denaturierenden SDS-PAGE mit anschließender Coomassiefärbung und einem HA-Test durchgeführt.

Für Messungen mit der mikroskaligen Thermophorese (siehe Abschnitt 3.2.21) wurde das aufgereinigte bHA wie folgt fluoreszenzmarkiert:

100 µg (1 mg/ml) Influenza bHA wurden mit Alexa647-NHS in DPBS bei einem molaren Verhältnis von 1:3 (Protein zu Farbstoff) über Nacht bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Am Folgetag wurde mittels eines Größenaufreinungsverfahrens unter Zuhilfenahme einer G-25

Säule nichtgebundener Farbstoff von markiertem Protein abgetrennt. Um zu überprüfen, dass durch die Markierung die Bindungsfähigkeit von bHA gegenüber Sialinsäuren nicht beeinträchtigt wurde, wurde ein HA-Test durchgeführt. Der Grad der Markierung wurde spektroskopisch mit einem Nanodropgerät ermittelt. Das Verhältnis von Protein zu Alexa647 war ungefähr 1:1.

3.2.11 Hämagglutinationsinhibition

Zunächst wurde der HA-Titer einer Viruslösung je nach Bedarf auf 2 oder 4 HAU/5 µl mittels eines HA-Tests (siehe 2.2.2) eingestellt. Zur Bestimmung der Hämagglutinationsinhibitionskonstante (KiHAI) eines Inhibitors wurde dieser in einer seriellen zweifach Verdünnung in 20 µl DPBS in einer 96-Schachtplatte verdünnt und mit 2 oder 4 HAU Influenzaviren für 30 min bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Im Anschluss wurden 50 µl einer 1 % (v/v) Erythrozytenlösung pro Schacht hinzugegeben und eine weitere Stunde bei RT inkubiert. Die geringste Inhibitorkonzentration, die in der Lage war, eine virusbedingte Hämagglutination vollständig zu hemmen, entspricht der Inhibitorkonstante KiHAI. Für schwache Binder oder solche, die eine unspezifische Wechselwirkung mit roten Blutzellen aufwiesen, wurden stets 2 HAU verwendet, um eine Inhibition zu detektieren.

3.2.12 Quantifizierung von Einzelzellbindung mittels Durchflusszytometrie

Hierfür wurden Influenzaviren bei einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml mit dem Lipidmembranmarker R18 (20 µM) für 30 min bei RT unter leichtem Schütteln gefärbt. Nicht gebundener Farbstoff wurde durch Pelletierung der Viren bei 25.000 x g für 5 min entfernt. Das Viruspellet wurde resuspendiert und die Viruslösung wieder auf das Ausgangsvolumen gebracht. Dann wurden 5 µg (16 HAU/µl) mit 5 µl einer seriellen Inhibitorverdünnung für 30 min bei RT inkubiert. Als nächstes wurde 40 µl einer 1 % (v/v) Erythrozytenlösung hinzugegeben und die Mischung für 20 min bei RT inkubiert. Nicht gebundene Viren wurden mittels eines Waschschrittes durch Zentrifugation bei 1.500 x g für 10 min entfernt. Das resuspendierte Erythrozytenpellet wurde mit Durchflusszytometrie auf Fluoreszenzintensität von R18 bei 590 nm untersucht. Als Negativkontrolle dienten Erythrozyten, die nicht mit Virus behandelt wurden, und als Positivkontrolle Erythrozyten, die nur mit DPBS behandelten Viren inkubiert wurden. Je Probe wurden 5.000 Objekte mittels eines Durchflusszytometers (Calibur, BD Science) detektiert und eine einheitliche Zellpopulation auf Basis des vorwärts (engl. *forward scatter*, kurz: FSC) und seitwärts Streulichts (engl. *side scatter*, kurz: SSC) gruppiert. Von jeder Gruppe aus unabhängigen Proben wurde der Median der Fluoreszenzintensitäten ermittelt. Die Hintergrundfluoreszenz aus der Negativprobe wurde von allen Werten abgezogen und die Differenzwerte im Verhältnis zur Positivprobe prozentual dargestellt. Mittelwerte aus wiederholten Messungen wurden gegen die eingesetzte Inhibitorkonzentration graphisch dargestellt und die Datenpunkte mit einer 4-

parametrischen logarithmischen Funktion angepasst. Daraus ließ sich die halb maximale Konzentration (IC_{50}) mit ihrem asymmetrischen Standardfehler (logSE) ermitteln. Der IC_{50} ist stellvertretend und charakteristisch für das Bindungsinhibitionspotential einer chemischen Verbindung, die nötig ist, die eingesetzte Virusmenge zu inhibieren.

Für die Bestimmung von Einzelzellbindung verschiedener Proteinfractionen aus einem Saccharose-Dichtegradienten mit A/Panama (H3N2) Viren wurden 5 μ g R18-markierte Virusfraktionen mit 100.000 Zellen (MDCK-II, A549, HeLa) vermengt und es wurde analog zu den Versuchen mit Erythrozyten vorgegangen.

3.2.13 Fusionsinhibitionstests

Zur Ermittlung des Inhibitionsentials des viralen Fusionsprozesses wurde ein Fluoreszenzbasierter Fusionstest mit R18 membranmarkierten Influenzaviren (siehe 3.2.13) und Erythrozytenmembranvesikeln, auch „Ghosts“ genannt, durchgeführt.

Die Färbung der Virusmembran mit einer relativ hohen Konzentration an R18 führt zu einer Fluoreszenzlöschung der Rhodaminfluoreszenz. Erst durch eine Membranlyse oder die Verschmelzung einer markierten mit einer unmarkierten Membran wird der mittlere Abstand zwischen den Fluorophoren vergrößert und die Fluoreszenzlöschung aufgehoben. Bei gleichbleibender Anregung spiegelt sich dieser Vorgang in einer zeitabhängigen Erhöhung der Fluoreszenzintensität wider. Auf dieser Grundlage kann der zeitliche Fusionsverlauf in Gegenwart von festgelegten Umgebungsbedingungen beobachtet werden (Abbildung 5).

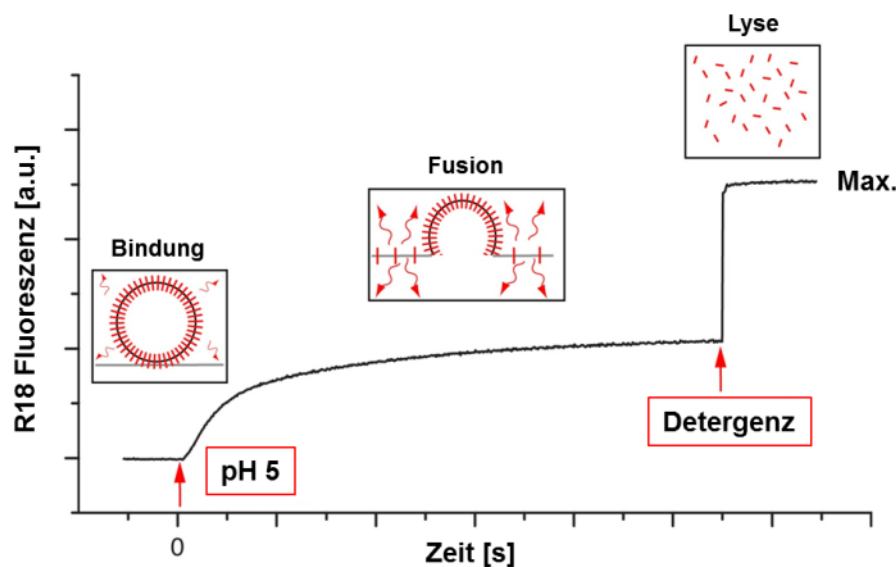


Abbildung 5: Fusionskinetik von IAV mit Modellmembranen. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Fluoreszenzintensität von R18-markierten Influenzaviren bei einer pH-getriggerten Virusfusion mit Erythrozytenmembranen. Für die Messung wurde die Virusmembran mit einer

relativ hohen Konzentration an R18 markiert, was zu einem Fluoreszenzquenching führt. Dadurch wird nur eine geringe Basalfluoreszenz gemessen. Durch Zugabe von Säure wird der pH-Wert herabgesetzt und die Virusfusion mit der Erythrozytenmembran ausgelöst. Es kommt zu einem kontinuierlichen Anstieg der Fluoreszenzintensität, die in einer Sättigung mündet. Beim Erreichen des Sättigungsignals wird ein Detergenz hinzugegeben, um sämtliche Membranen zu lysieren. Dadurch wird das membranhaltige R18 freigesetzt und die Maximalfluoreszenz kann zu Normierungszwecken bestimmt werden.

Standardmäßig wurden 5 µg R18-markierte Influenzaviren für 30 min mit oder ohne Inhibitoren bei RT inkubiert. Danach wurden 40 µl Ghosts hinzugegeben, mit den Viren vermengt und für 10 min auf Eis inkubiert. Dadurch wird eine spontane, temperaturabhängige Fusion mit den Ghosts minimiert und lediglich Bindung der Viren an die Ghostmembran erlaubt. Nicht gebundene Viren wurden durch einen Waschriff (5 min, 300 x g, 4 °C) entfernt. Der Fusionsprozess wurde mit einem Spektrophotometer (Fluoromax) in Fusionspuffer bei 37 °C untersucht. Zunächst wurden 2 ml vorgewärmter Fusionspuffer in eine Quartzküvette gefüllt. 50 µl der vorbehandelten Virus-Ghostmischung wurden hinzugegeben und über einen Magnetrührer kontinuierlich gemischt. Zur Ermittlung der Basisfluoreszenz wurden die Fluoreszenzintensität (Ex./Em.: 560/590 nm, Schlitzbreite Lichtquelle/Detektor: 5 nm) über 30 s gemessen. Um die pH-abhängige Fusion zu starten, wurden nach Unterbrechung der Messung 20 µl Citratpuffer (250 mM) der Mischung zugesetzt, wodurch der pH-Wert der Lösung auf ca. pH 5,5 eingestellt wurde. Dann wurde die Messung wiederum für 240 s aufgenommen. Anschließend wurden die Messung endgültig beendet und 50 µl 20 % (v/v) Triton X-100 zugesetzt, um sämtliche Membranen zu lysieren und die maximale Fluoreszenz der freigesetzten R18-Moleküle für 30 s zu detektieren. Von allen Messungen wurde die Basisfluoreszenz abgezogen und auf die Maximalfluoreszenz normiert. Die so erhaltenen Werte wurden wiederum auf eine Positivkontrolle mit DPBS behandelten Viren normiert. Daraus ergibt sich folgende Formel zur Berechnung des FDQ:

$$(9) \quad FDQ = \left[F(t) - \frac{F(0)}{F(max)} - F(0) \right] \times 100 \%$$

Die Prozentmittelwerte aus unabhängigen Messungen wurden gegen die eingesetzte Inhibitor-konzentration aufgetragen und die Datenpunkte mit Hilfe einer 4-parametrischen, logarithmischen Funktion angepasst. Daraus ließ sich die halbmaximale Fusionseffizienz (IC₅₀) mit ihrem Fehler (logSE) ermitteln.

Alternativ wurde ein Hämolysetest in einem miniaturisierten Format nach Zhu und Mitarbeitern in leicht abgewandelter Form durchgeführt ([Zhu, Li et al. 2011](#)). Zu Beginn wurde eine frische 2 % (v/v) humane Erythrozytenlösung in DPBS angesetzt. Eine Verdünnungsreihe von 100 µl Inhibitorlösung in DPBS wurde mit gleichem Volumen Viruslösung (16 HAU/ 100 µl) für

30 min bei RT in einer 96-Tiefschachtplatte inkubiert. Anschließend wurden 200 µl einer auf 37 °C vorgewärmten Erythrozytenlösung pro Schacht hinzugegeben und die Mischung für weitere 30 min bei 37 °C inkubiert. Zur Aktivierung viraler Fusion wurden nach der Inkubation 100 µl Natriumacetatlösung (0,5 M, pH 5,2) hinzugegeben, die Platte kurz geschüttelt und weitere 30 min bei 37 °C inkubiert. Um nicht lysierte Erythrozyten vom hämoglobinhaltigen Überstand abzutrennen, wurde die Platte anschließend bei 1500 x g für 6 min zentrifugiert. 300 µl des Überstandes nach der Zentrifugation wurden dann auf eine neue Platte transferiert und mit einem Plattenleser die Absorption bei 540 nm spektroskopisch ermittelt. Der prozentuale Anteil der Hämolyseinhibition errechnet sich wie folgt:

$$(10) \quad \text{Hämolyseinhibition (\%)} = \frac{1 - (\bar{x}_{\text{Abs}540}(\text{Substanz}) - \bar{x}_{\text{Abs}540}(\text{DPBS}))}{(\bar{x}_{\text{Abs}540}(\text{DMSO}) - \bar{x}_{\text{Abs}540}(\text{DPBS}))} \times 100$$

$\bar{x}_{\text{Abs}540}(\text{DPBS})$ steht für den Mittelwert der Absorption der Erythrozytenlösung, $\bar{x}_{\text{Abs}540}(\text{DMSO})$ für die Absorption von virushaltigen Proben in Gegenwart von DMSO und $\bar{x}_{\text{Abs}540}(\text{DPBS})$ für die Absorption von Proben die mit Virus und einer zu untersuchenden Substanz inkubiert wurden.

3.2.14 Mikroskopie

Alle Bildaufnahmen wurden in einem klimatisierten Raum bei Raumtemperatur durchgeführt. Zur Aufnahme von Mikroskopiebildern wurde ein Olympus FV1000 konfokales Laserrastermikroskop (engl. *confocal laser scanning microscope*) verwendet. Bei diesem Mikroskopieverfahren wird ein Objekt mit einem Laserstrahl durch punktuelle Belichtung angeregt und nach dem Durchtritt von emittiertem Licht durch eingestellte Filter und einer Aperturblende Fluoreszenz über einen Sekundärelektronenvervielfacher detektiert. Auf diese Weise können spezifische Fluoreszenzsignale mit hoher Tiefenschärfe innerhalb eines Objekts lokalisiert und quantifiziert werden. Das detektierte Signal erzeugt ein elektrisches Signal, das wiederum in digitale Pixel transformiert wird und zusammengesetzt ein Abbild des abgerasterten Objekts erzeugt. Das verwendete Mikroskop verfügte über ein 405, 488 und 559 nm Diodenlaser. Für die Aufnahmen wurde ein 20-fach (N.A. = 0,5) oder 40-fach (N.A. = 0,75) Objektiv verwendet. Für die Detektion unterschiedlicher Fluorophore wurden Objekte im sequenziellen Anregungsmodus (engl. *sequential scan mode*) beleuchtet, um eine unspezifische Anregung von Fluorophoren durch spektrale Überlagerung zu unterbinden. Darüber hinaus wurde über einen digitalen 3-fach Kalmanfilter das Signal- zu Rauschverhältnis verbessert. Verwendete Fluorophore wurden wie folgt angeregt und gefiltert: DAPI, (Ex.405 nm/ 425-475 nm Filter), FITC und Alexa488 (Ex.488 nm / 500-545 nm Filter) und R18 (Ex. 559 nm/ 570-670 nm Filter).

3.2.15 Immunodetektion und Quantifizierung von Influenza Nukleoproteinsignal

Für die Ermittlung von IAV-Inhibition wurde als Maß für das Inhibitionspotential einer antiviralen Substanz die Expressionseffizienz von NP^{IAV} nach Behandlung von Influenzaviren mit Bindungsinhibitoren quantifiziert. Zu Beginn wurden 50.000 MDCK-II oder A549 Zellen pro Schacht einer 8-Schacht Platte mit Poly-L-Lysin beschichtetem Glasboden (ibidi) ausgesät. Am folgenden Tag wurden X31 Viren (MOI 0,1) in Gegenwart oder Abwesenheit eines Bindungsinhibitors für 30 min bei RT inkubiert. Die für die Infektion vorbereiteten Zellen wurden auf Eis mit DPBS^{+/+} gewaschen, temperiert und mit den vorbehandelten Viren überschichtet. Eine einstündige Inkubation auf Eis erlaubt den Viren nur eine Bindung an Zellen, während eine energieabhängige Aufnahme von Viren unterbunden und eine synchronisierte Infektion gewährleistet ist. Anschließend wurden nicht gebundene Viren durch Waschen entfernt und die Zellen mit frischem Infektionsmedium II (ergänzt mit 2,5 µg/ml TPCK) für 24 h bei 37 °C inkubiert. Alternativ wurden A549-Zellen mit Inhibitor behandelten oder unbehandelten A/Panama (H3N2) Viren (MOI 1) infiziert und nur für 6 h inkubiert.

Im nächsten Schritt wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit DPBS^{+/+} gewaschen und mit 4 % PFA-Lösung für 15 min bei RT fixiert. Danach wurde die Fixierlösung entfernt und die Zellen wiederholt mit DPBS^{+/+} gewaschen und mit 0,5 % (w/v) Triton X-100 für 15 min bei RT permeabilisiert. Um die Autofluoreszenz freier Aldehydgruppen und um unspezifische Bindungen zu minimieren, wurden die Zellen nach weiteren Waschschritten mit DPBS^{+/+} für 2 h bei RT mit Blockierpuffer behandelt. Danach wurden die Zellen mit anti-NP^{IAV} Antikörper in 3 % (w/v) BSA für 1 h bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wiederholt mit DPBS^{+/+} gewaschen und Zellkerne mit 300 nM DAPI für 10 min bei RT gefärbt. Zuletzt wurden die Zellen zur Konservierung in Mowiol 4-88 eingebettet und mikroskopiert.

Pro Schacht wurden Bilder mit insgesamt ca. 1.000 Zellen aufgenommen und mittels des Bildanalyseprogramms ImageJ ausgewertet. Hierbei wurde anhand des Fluoreszenzsignals des detektierten Influenzanukleoproteins (NP^{IAV}) das NP^{IAV}-Expressionsniveau quantifiziert. Nach Abzug der Fluoreszenzwerte nichtinfizierter Zellen von allen Messungen wurde die mittlere Fluoreszenzintensität von inhibitorbehandelten Proben im Verhältnis zu DPBS^{+/+} behandelten Proben grafisch dargestellt. Zur Bestimmung der Signifikanz wurden die Mittelwerte einer Probe aus unabhängigen Experimente mit der infizierten und mit DPBS^{+/+} behandelten Positivkontrolle mittels einer Ein-Weg-Varianzanalyse (ANOVA) statistisch ausgewertet. Für die Korrektur der Alphafehlerakkumulation wurde im Anschluss ein vielfacher Vergleichstest nach Dunnett (engl. *Dunnett's multiple comparison test*) im Vergleich zur DPBS^{+/+}-Kontrollgruppe durchgeführt.

3.2.16 Mikroneutralisationstest

Der Mikroneutralisationstest wurde mit kleinen Modifikationen wie von Klimov und Mitarbeitern beschrieben durchgeführt ([Klimov, Balish *et al.* 2012](#)). Zu Beginn wurde eine Verdünnungsreihe der zu untersuchenden Inhibitoren in einer 96-Schachtpatte angesetzt und mit 200 TCID₅₀ A/X31 (H3N2) oder 50 TCID₅₀ A/mute swan/Rostock (H7N1) für 30 min bei RT inkubiert. DPBS^{+/+} behandelte Viren dienten als Positivkontrolle. Folgend wurden 30.000 MDCK-II Zellen pro Schacht zugesetzt und für 18 h bei 37 °C inkubiert. Nicht infizierte Zellen dienten als Negativkontrolle. Am Folgetag wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit DPBS^{+/+} gewaschen und mit eiskaltem 80 % (v/v) Aceton für 10 min bei RT fixiert. Danach wurde das Fixiermittel abgenommen und die Platte getrocknet. Dann wurden die Zellen mit anti-NP^{IAV}-Antikörper 1:1000 in Antikörperverdünnungspuffer II für 1 h bei RT inkubiert, wiederholt mit Waschpuffer gespült und mit einem peroxidasegekoppelten anti-Maus Antikörper (1:1000 in Antikörperverdünnungspuffer II) für eine weitere Stunde bei RT inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen wiederholt mit Waschpuffer gespült und für 30 min mit σ -Phenylendiamindihydrochlorid (OPD) in Citratpuffer inkubiert. Nach Farbumschlag des Überstandes wurde die Reaktion mit 0,5 M Schwefelsäure gestoppt und die Absorption bei 490 nm gemessen. Nachdem das Hintergrundsignal der Negativkontrolle von allen Werten subtrahiert wurde, konnte das Neutralisationspotential eines Inhibitors durch das Verhältnis von Inhibitor behandelten Proben zu unbehandelten infizierten Proben ermittelt werden.

3.2.17 Zellviabilitätstest

Das zugrundeliegende Prinzip dieses kolorimetrischen Testverfahrens ist die Bestimmung der mitochondrialen Aktivität, welche linear proportional mit der Anzahl an Zellen korreliert. Für die Bestimmung der Mitochondrienaktivität wurde das Reagenz MTS (Promega) verwendet, welches nach dem Eintritt in Zellen an den Mitochondrien enzymatisch zu orangefarbenem Formazan reduziert wird und somit durch eine Absorptionsmessung detektiert werden kann. Dieser Viabilitätstest wurde sowohl zur Ermittlung zytotoxischer Eigenschaften einer chemischen Verbindung als auch zur Quantifizierung einer inhibitorverursachten Reduktion viraler Zytopathogenität eingesetzt. Für Proben, die nur in sehr geringem Synthesemaßstab hergestellt werden konnten, wurde ein CellTiter-Glo lumineszenzbasierter Zellviabilitätstest im 384-Schachtformat (weiße Platten) durchgeführt (Promega). Mit diesem Testverfahren kann der ATP-Level nach der Zelllyse anhand eines Luciferasereporters detektiert werden. Das ATP-Niveau korreliert direkt proportional mit der Anzahl an lebenden Zellen.

Für den Versuch wurden 15.000 Zellen (MDCK-II oder A549) pro Schacht einer 96-Schachtpatte oder 4.000 Zellen in eine 384-Schachtpatte ausgesät. Am Folgetag wurde auf einer se-

paraten Platte eine Inhibitorverdünnungsreihe in DPBS^{+/+} vorbereitet und mit Virus (MOI 0,05; Infektionshemmungstest) oder nur mit Inhibitor (Zytotoxizitätstest) für 30 min bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Danach wurden die vorbereiteten Zellen mit DPBS^{+/+} gewaschen und mit der vorbereiteten Verdünnungsreihe für 1 h bei RT behandelt. Folgend wurde die Inhibitorlösung entfernt und die Zellen mit Infektionsmedium I (MDCK-II) oder II (A549) gewaschen und für 24 h bei 37°C inkubiert. Bei Versuchen, in denen der Inhibitor nicht nach 1 h entfernt wurde, wurden Zellen mit der Inhibitor-Virusmischung für 24 h inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit Detektionsreagenz auf RT temperiert, mit dem entsprechenden Detektionsreagenz versetzt und dann mittels eines Plattenlesers ausgelesen.

Zur Bestimmung von IC₅₀-Werten wurde das Hintergrundsignal des Mediums von allen Werten subtrahiert, eine Normierung anhand der Virus- und Zellkontrolle vorgenommen und über eine 4-parametrische Kurvenanpassung dargestellt:

$$(11) \quad S_C = S_{Zellkontrolle} + \left(\frac{S_{Virus} - S_{Zellkontrolle}}{1 + 10^{((\log IC_{50} - c(Inhibitor)) * b)}} \right)$$

S_c steht für das gemessene Signal bei einer gewählten Inhibitorkonzentration, S_{Virus} für das Signal in Gegenwart einer unbehandelten Viruskontrolle (maximale Zytotoxizität), S_{Zellkontrolle} für eine unbehandelte Zellkontrolle und b für den Hill-Koeffizienten.

3.2.18 Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie gestützte Bindungsmessungen

Zur Quantifizierung der Bindungskinetik und der Inhibition von IAV durch monovalente Liganden an verschiedenen beschichtete Oberflächen wurde die Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (SPR) verwendet. Diese markierungsfreie Methode detektiert in einer Fließzelle die Änderung der Masse auf einem Goldchip, die durch Bindung eines injizierten Analyten an immobilisierte Liganden auf der Goldchipoberfläche zustande kommt. Die Massenänderung kann optisch anhand der Änderung des Brechungsindex von polarisiertem Licht, welches auf die mit Analyten beschichtete Goldoberfläche gerichtet ist (Totalreflexion), detektiert werden. Das Messsignal korreliert mit der Masse an der Goldoberfläche (1 RU = 1pg/mm²) ([Karlsson, Fagerstam et al. 1993](#)).

Für SPR-Messungen wurde ein Biacore-T100 (GE-Healthcare, Bio-Sciences AB) Gerät mit CM5-Chips (GE Healthcare, Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden) verwendet. Der Chip ist mit einer carboxylbeschichteten Oberfläche versehen, um unspezifische Interferenzen mit der Goldchipoberfläche zu reduzieren. Für die Immobilisierung von Liganden auf dem Goldchip wurden die Carboxylgruppen durch Injektion einer EDC/NHS Lösung (0,4/0,1 M) für 420 s bei einer Fließgeschwindigkeit von 10 µl/min aktiviert. Anschließend wurde eine Waschinjektion

vorgenommen und über eine Aminkopplung Neutravidin (100 µg/ml; pH 5,5; 5 µl/min, 800 s) zur Immobilisierung von biotinylierten Liganden vorgenommen. Zur Absättigung nichtgebundener NHS-Gruppen wurde eine 1 M Ethanolaminlösung (pH 8,5) über einen Zeitraum von 420 s (10 µl/min) injiziert. Zur Immobilisierung von biotinylierten Liganden (A22-Biotin, α -2,6-SL-Biotin) wurden Stammlösungen (10 µg/ml) in HBSP-Puffer für 180 s bei einer Fließrate von 10 µg/min injiziert. Zur Absättigung wurden die Fließzellen für 1 min mit 10 µM Biotinlösung geblockt. Bindungsexperimente wurden in HBSP-Puffer bei RT durchgeführt. Für die Immobilisierung von Lys-PeB wurde eine Aminkopplung über Carboiimid vermittelte Aktivierung der Carboxylgruppen vorgenommen ([Wijaya, Lenaerts et al. 2011](#)). Messungen mit Aptameren wurde in Gegenwart von 5 mM MgCl₂ und 0,5 U/ml RNAsin durchgeführt. Für Bindungsstudien wurden zwei experimentelle Vorgehensweisen etabliert:

1. Für die Ermittlung der Bindungskinetik von A/X31 (H3N2) und A/Panama (H3N2) Viren an multivalente Oberflächen wurden über einen Dichtegradienten (siehe Abschnitt 3.2.8) aufgereinigte Viren verwendet. A/Panama (H3N2) Viren wurden hierbei in eine Fraktion mit vorwiegend sphärischen und eine mit vorwiegend filamentösen Viren aufgetrennt. Für SPR-Messungen wurde ein CM5-Chip, bestehend aus vier Fließzellen, verwendet. Zunächst wurde jede Fließzelle wie zuvor beschrieben mit Neutravidin für Bindung an biotinylierte Liganden oder für eine Aminkopplung vorbereitet. Fließzelle 1 wurde als Referenzfließzelle herangezogen, Fließzelle 2 wurde mit biotinylierten α -2,6-SL, Fließzelle 3 wurde mittels Aminkopplung von Lys-PeB und Fließzelle 4 mit A22-Biotin funktionalisiert. Dabei wurde versucht, durch Injektion gleicher Massenkonzentrationen (10 µg/ml) eine ähnliche Beschichtungsdichte zu erreichen: 1000 RU α -2,6-SL (312 fmol/mm²), 1800 RU A22 (89,6 fmol/mm²), 420 RU Lys-PeB (256 fmol/mm²). Zur Bestimmung der Bindungskinetik wurden Viren bei unterschiedlichen Konzentrationen (A/X31 (H3N2): 10 - 0,0032 µg/ml; A/Panama (H3N2): 200 - 0,064 µg/ml) bei einer Fließrate von 10 µl/min injiziert.
2. Für Bindungskompetitionsexperimente wurden A/X31 (H3N2) Viren (10 µg/ml) mit oder ohne Inhibitoren für 30 min inkubiert. Dann wurde das Bindungspotential von Inhibitor behandelten Viren gegenüber einer α -2,6-SL-Biotin beschichteten Oberflächen gemessen und mit dem von unbehandelten Viren verglichen. Als Kontrollen dienten eine nicht funktionalisierte Referenzzelle und Kontrollinjektionen mit einer Inhibitorverdünnungsreihe ohne Virus. Nach jeder Inhibitor bzw. Inhibitor-Virus Messreihe folgte zur Überprüfung der Bindungskapazität des Chips eine Viruskontrollmessung ohne Inhibitor. Die Viren wurden bei einer Fließrate von 10 µl/min injiziert.

Die Funktion des Bindungsmodells basiert auf dem Langmuirmodell, das eine 1:1 Stöchiometrie zwischen Analyten und Liganden annimmt:

$$(12) \quad \frac{d[AB]}{dt} = [A][B]k_{on} - [AB]k_{off}$$

Die gemessenen Kinetiken wurden dann mittels einer Biacore Evaluation Software 1.1 vorgenommen. Diese Software wendet auf die SPR-Kurven über ein numerisches Integrationsverfahren eine globale Kurvenanpassung an, die sich auf den Levenberg-Marquardt-Algorithmus zurückführen lässt ([Morton, Myszka et al. 1995](#)). Dieser Algorithmus basiert auf dem Prinzip der kleinsten Quadrate.

$$(13) \quad S = \sum_1^n (r_f - r_x)^2$$

Hierbei steht S für die Summe der Fehlerquadrate, r_f für den angepassten Wert an jedem Datenpunkt und r_x für den experimentell ermittelten Wert am selben Datenpunkt.

Für Bindungskompetitionsexperimente wurde anhand des relativen Bindungssignals einer konstanten Konzentration an Viren (Analyt) in Gegenwart unterschiedlicher Mengen an Inhibitoren an die α -2,6-SL beschichtete Oberfläche vermessen. Alle Werte wurden ins Verhältnis zum Bindungssignal einer unbehandelten Viruskontrolle (R_{max}) gesetzt. Dann wurden die relativen Bindungswerte über eine 4-parametrische, logarithmische Funktion (siehe Abschnitt 3.2.17) angepasst, um IC_{50} -Werte zu erhalten.

3.2.19 Affinitätsmessungen mittels mikroskaliger Thermophorese

Diese Messungen wurden mit einem Monolith NT.115 durchgeführt. Das Gerät war mit einer grünen und einer roten LED ausgestattet. Alle Messungen wurden bei 22 °C und mit Standardkapillaren durchgeführt. Zur Affinitätsmessung wurden die Liganden seriell 1:2 in DPBS verdünnt und mit R18-markierten A/X31 (H3N2) (4 HAU, $c_{final} \approx 0,1$ nM Viruspartikel) oder 20 nM Alexa647 markiertem bHA gemischt. Die verwendeten Viren wurden vor der Messung mittels eines 0,45 μ m Filters separiert, um Virusaggregate zu entfernen (siehe Abbildung 6). Durch die Filtration ließen sich verlässlichere Fluoreszenzmessungen aufnehmen, wie sich an einem geglätteten Kurvenverlauf des Thermophoresesignals zeigt (siehe Abbildung 6, rechte Spalte).

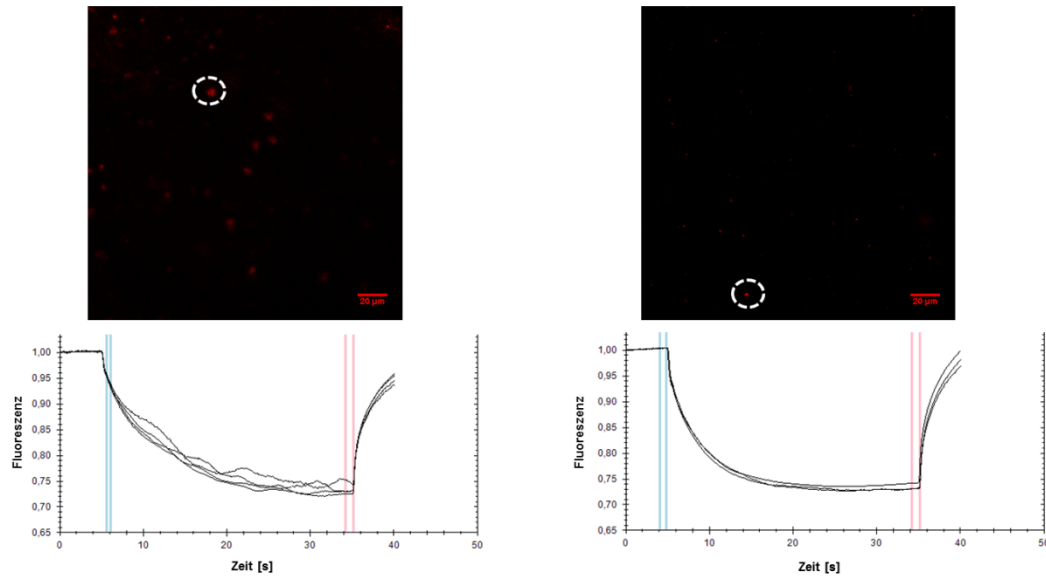


Abbildung 6: Mikroskopie und MST-Signalkurven von R18-markierten A/X31 (H3N2) Viren. Dargestellt sind unfiltrierte Viren (linke Spalte) und Viren nach Filtration mittels eines 0,45 µm Filters (rechte Spalte). R18-markierte Viren sind mit einem weißen Kreis hervorgehoben. Die vertikalen Linien in der MST-Signalkurve markieren die Fluoreszenzintensität zu Beginn der Messung (blaue Linien) und am Ende der Messung (rote Linien).

Nach einer kurzen Inkubation bei RT wurde die Verdünnungsreihe in Glaskapillaren geladen und in das MST-Gerät eingeführt. Zu Beginn jeder Messung wurde die Initialfluoreszenz gemessen, um sicher zu stellen, dass jede Kapillare ungefähr dieselbe Fluoreszenz enthält. Eine massive Änderung des pH-Wertes durch erhöhte α -2,6-SL-Konzentrationen konnte ausgeschlossen werden, wie die pH-Wert Bestimmung einer α -2,6-SL-Titrationsreihe belegt (siehe Abbildung 7).

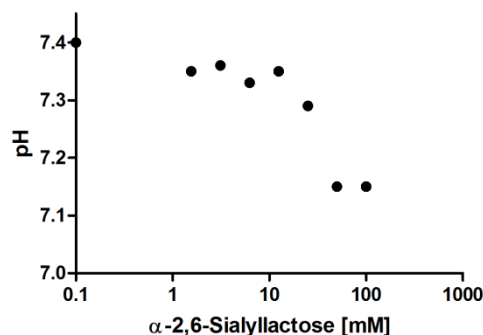


Abbildung 7: Einfluss der α -2,6-Sialyllactose-Konzentration auf den pH-Wert. Messungen wurden in DPBS durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte aus zwei Messungen.

Für die Messung mit markierten Viren wurde standardmäßig mit einer MST-Leistung (engl. *MST power*) von 80 % und einer LED-Leistung (grüne LED) von 100 % gearbeitet. Messungen mit Alexa647 markiertem bHA (ca. 240 kDa) wurde mit einer MST-Leistung von 20 % und

einer LED (rote LED) Leistung von 30 % durchgeführt. Für den zeitlichen Messverlauf wurde ein vom Hersteller (Nanotemper) standardmäßiges Operationsskript gewählt: 1. Messung der Initialfluoreszenz (5 s), 2. Einschalten des Infrarotlasers, 3. Messung des Thermophoreseprozesses (30 s), 4. Ausschalten des Infrarotlasers mit Messung der Rückdiffusion (5 s) (Abbildung 4). Zur Bestimmung des Hintergrundrauschens wurde die für Experimente eingesetzte Verdünnung an markiertem Protein in Probenpuffer wiederholt gemessen. Üblicherweise zeigten Messungen mit Virus oder bHA ein Hintergrundrauschen von $\Delta F_{\text{Virus}} \approx 4$ FU bzw. $\Delta F_{\text{bHA}} < 1$ FU. Die Änderung der Fluoreszenz wurde als gebundene Fraktion der maximalen Fluoreszenz im gebundenen Zustand dargestellt. Dissoziationskonstanten, welche auf multivalente Interaktionen beruhen, wurden als apparente Dissoziationskonstanten ($K_{D,app}$) bezeichnet. Dissoziationskonstanten wurden aus einer Kurvenanpassung an Mittelwerten unabhängiger, wiederholter Messungen bestimmt. Im Gleichgewichtszustand kann über folgende Funktion, die auf dem Massenwirkungsgesetz beruht, die Dissoziationskonstante bestimmt werden ([Seidel, Dijkman et al. 2013](#)):

$$(14) \quad F = \frac{BL}{B} = \frac{1}{2B} (B + L + KD_{app} - \sqrt{(B + L + KD_{app})^2 - 4B * L})$$

L steht für die Konzentration an unmarkiertem Liganden. B steht für die konstant gehaltene Konzentration an markiertem Protein (hier: Virus oder bHA) und F repräsentiert den Anteil an gebundenem Liganden im Komplex (BL).

In wenigen Ausnahmen (bspw. Liganden mit PEG-Linker) musste für eine bessere Kurvenanpassung ein Hill-Bindungsmodell als alternatives Modell herangezogen werden (Gleichung 2):

$$(15) \quad F = \frac{1}{(1 + \frac{Kd_{app}}{L^b})}$$

b steht für den Hill-Koeffizienten.

3.2.20 Infektionsinhibition im *in vivo* Mausmodell

Um eine *in vivo* Anwendung von antiviralen Substanzen zu bestimmen, wurden einige IAV-Inhibitoren im Mausmodell getestet (Abbildung 8). Diese Experimente wurden mit acht Wochen alten weiblichen BALB/c Mäusen (Charles River) unter Berücksichtigung gesetzlicher Richtlinien (siehe 3.2.1) durchgeführt. Jeweils fünf Mäuse bildeten eine Gruppe, die gemeinsam in einem Tiergehege gehalten wurden. Für diese Inhibitionsstudien wurden A/X31 (H3N2) Viren (100 pfu) mit oder ohne Inhibitor für 30 min bei RT inkubiert. Zu Beginn des Experiments wurden die Mäuse durch eine intraperitoneale Injektion mit 200 µl Cepetor (4 µg/ 100 µl) sediert und durch Exposition in einer Isofloran Atmosphäre anästhesiert. Dann wurde jeder Maus intranasal 25 µl der vorinkubierten Virus-Inhibitormischung verabreicht. Nachdem sicherge-

stellt wurde, dass die Mäuse die Lösung komplett aufgenommen hatten, wurden die Mäuse mit Antisedan wieder revitalisiert. Über einen Zeitraum von 11 Tagen wurden die Mäuse täglich inspiziert und das Körpergewicht kontrolliert. Für statistische Zwecke wurden die Mittelwerte aus unabhängigen Experimenten von inhibitorbehandelten Kohorten mit denen von DPBS^{+/+} behandelten Kohorten mittels einer Ein-Weg-Varianzanalyse (ANOVA) und einem Folgetest nach Dunnett verglichen.

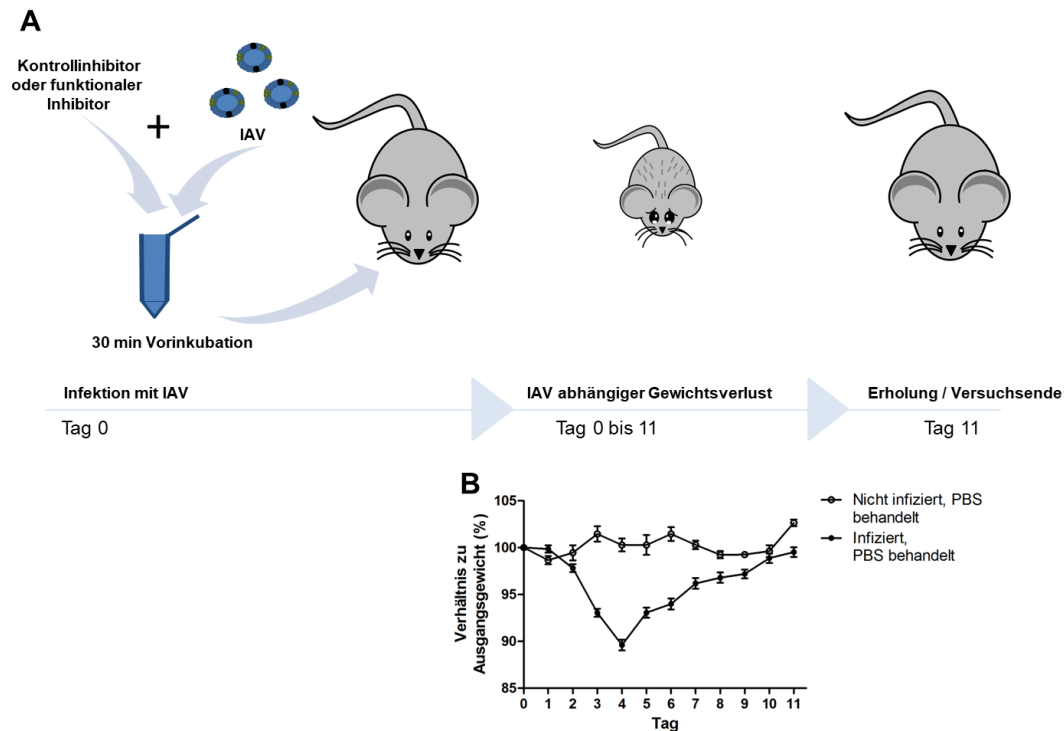


Abbildung 8: Schematische Darstellung des IAV-Infektionsmodells mit Mäusen. A) Am Tag 0 des Experiments wurden 100 pfu A/X31 (H3N2) mit verschiedenen Virusbindern für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Virus-Inhibitormischung über eine intranasale Gabe sedierten BALB/c Mäusen verabreicht. Nach Revitalisierung wurden die behandelten Mäuse dann über einen Zeitraum von 11 Tagen beobachtet. Aufgrund der Infektion mit IAV verlieren die Mäuse an Körpergewicht, welches ein Minimum an Tag 4 erreicht. Die Verabreichung einer sublethalen Dosis (100 pfu) an Influenzaviren führte ab Tag 4 zu einer Erholung bzw. wieder zu einer Gewichtszunahme der Mäuse, die bis Tag 11 vollständig erfolgt. B) Darstellung des Gewichtsverlustes im Verhältnis zum Ausgangsgewicht an Tag 0. Mäuse, die ein DPBS^{+/+} Placebo erhielten, behielten ihr Körpergewicht. Mäuse, die mit DPBS^{+/+} behandelten Viren infiziert wurden, zeigten einen charakteristischen Gewichtsverlauf.

4. Ergebnisse

Ein multivalenter Binder besteht aus mehreren Rezeptoren, welche auf einem Gerüst immobilisiert sind (siehe Abschnitt 1.3.1). Die vorliegende Arbeit behandelt verschiedene monovalente HA-Binder und unterschiedliche Multivalenzträgersysteme im Hinblick auf eine Eignung für die Hemmung der viralen Aktivität von IAV. Der Ergebnisteil ist daher in mehrere Kapitel unterteilt (Abbildung 9): Im ersten Abschnitt wurden Peptide aus einem HA-bindenden Antikörper auf ein antivirales Potential untersucht und mit anderen HA-bindenden Peptiden, Zuckern und Aptameren verglichen. Im zweiten Abschnitt wurden Goldoberflächen mit je einem Vertreter dieser drei Rezeptorklassen beschichtet, um mittels SPR-Messungen die prinzipielle Eignung dieser Rezeptoren für eine multivalente Interaktion mit IAV bestimmen zu können. In den darauf folgenden Abschnitten werden strukturelle Aspekte von statistischen und räumlich definierten Rezeptor-Polymerkonjugate behandelt, die für eine optimale Inhibition von IAV notwendig sind. Im letzten Teil wurden A/Panama (H3N2) Viren nach Morphologie in sphärische und filamentöse Virionen aufgetrennt und deren Bindungsverhalten gegenüber multivalenten Oberflächen studiert.

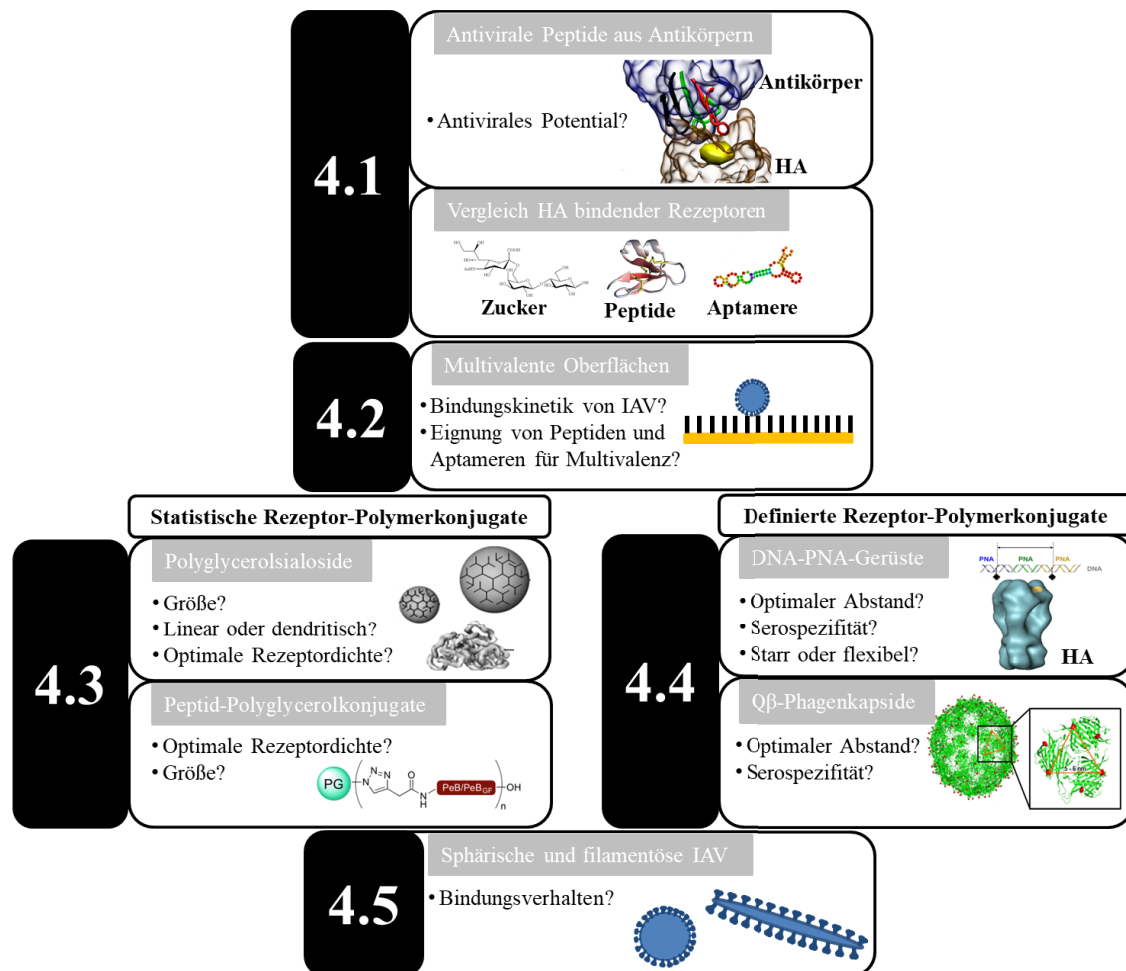


Abbildung 9: Kapitelübersicht des Ergebnisteils. Im ersten Abschnitt (4.1) wurden Peptide aus einem Antikörper auf ihr antivirales Potential gegen IAV untersucht und mit anderen bekannten HA-Bindern verglichen. Im zweiten Abschnitt (4.2) wurden das Bindungsverhalten von A/X31 (H3N2) gegenüber multivalente Oberflächen mit verschiedenen monovalenten Rezeptoren mittels SPR-Messungen charakterisiert. Im dritten Abschnitt (4.3) wurden statistische Polymersysteme, wie lineare und dendritische Polyglycerolsialoside, sowie Peptid-Polyglycerolkonjugate auf ihr antivirales Potential gegenüber IAV studiert. Dabei waren insbesondere Größe, Struktur und Rezeptordichte für eine optimale antivirale Aktivität von Interesse. Im vierten Teil des Ergebnisteils wurden Trägersysteme für eine räumlich definierte Rezeptorausrichtung untersucht. Mit PNA-DNA-Heteroduplexen wurde ein geeigneter bivalenter SA-Rezeptorabstand für eine optimale Interaktion mit HA gesucht. Q β -Phagenkapside hingegen wurden für die Identifikation einer optimalen trivalenten Interaktion mit HA herangezogen. Außerdem wurde mit den definierten Polymer-Rezeptorkonjugaten der Frage nachgegangen, ob eine Serospezifität bei unterschiedlichen Rezeptorabständen vorliegt. Im letzten Teil des Ergebnisteils (4.5) wurden sphärische und filamentöse A/Panama (H3N2) in ihrem Bindungsverhalten gegenüber multivalenten Oberflächen verglichen.

4.1 Monovalente IAV-Inhibitoren

Im folgenden Abschnitt werden Peptide aus einem HA bindenden Antikörper über diverse Bindungs-, Fusions- und Infektionsinhibitionsstudien auf ein antivirales Potential gegenüber IAV untersucht. Die Ergebnisse wurden dann mit denen von bekannten Peptiden, sowie mit HA-bindenden Zuckern und Aptameren verglichen.

4.1.1 Antivirale Peptide aus einem HA bindenden Antikörper

Peptidbinder gegenüber bestimmter Zielstrukturen können auf unterschiedliche Art und Weise generiert werden. Die meisten bekannten Vorgehensweisen basieren auf einem Screeningverfahren. Chemische Bibliotheken von bekannten Naturstoffen oder randomisierten Peptiden werden hierbei auf ihr Potential untersucht, bestimmte Zielstrukturen zu binden und deren natürliche Aktivität zu beeinflussen. Neben solchen Screeningverfahren konnten auch mit Hilfe des Phagendisplayverfahrens ([Smith and Petrenko 1997](#)) Peptidbinder gegen gewünschte Epitope selektiert werden. Ein wesentlicher Nachteil dieser beiden Methoden ist jedoch, dass die genaue Bindestelle an der Zielstruktur, sowie die für die Bindung essentiellen Aminosäuren des Binders erst durch weitere Untersuchungen aufgeklärt werden können.

Ein neuerer Ansatz bildet die Ableitung von Peptidbindern aus bereits charakterisierten Antikörperparatopen. Gegen HA des Influenzavirus A/X31 (H3N2)^{iv}, eine Reassortante mit HA und NA aus A/Aichi/2/1968 (H3N2), wurde ein Immunglobulin G (IgG)-Antikörper beschrieben ([Fleury, Wharton et al. 1998](#)), der am Rand der SA-Bindetasche über den Antikörperfragment-(Fab)-Teil der schweren Antikörperkette bindet (Abbildung 10 A). Diese Bindestelle ist ein konservierter Bereich innerhalb einiger IAV-Stämme ([Memczak, Lauster et al. 2016](#)). Das Paratop des HA bindenden Anteils des Antikörpers setzt sich aus drei komplementaritätsbestimmenden Bereichen (engl. *complementarity-determining regions*, CDR) zusammen. Folglich wurden drei Peptide synthetisiert, die je eine der drei CDR-Sequenzen enthalten (Tabelle 13). Aus jeder Region wurde ein Peptid abgeleitet und als PeA, PeB und PeC bezeichnet (Abbildung 10 B und D).

^{iv} Der HA-Typ aus A/X31 (H3N2) und A/Aichi/2/1968 (H3N2) ist identisch, jedoch wird zur Wahrung der Konsistenz, die Bezeichnung A/X31 (H3N2) beibehalten.

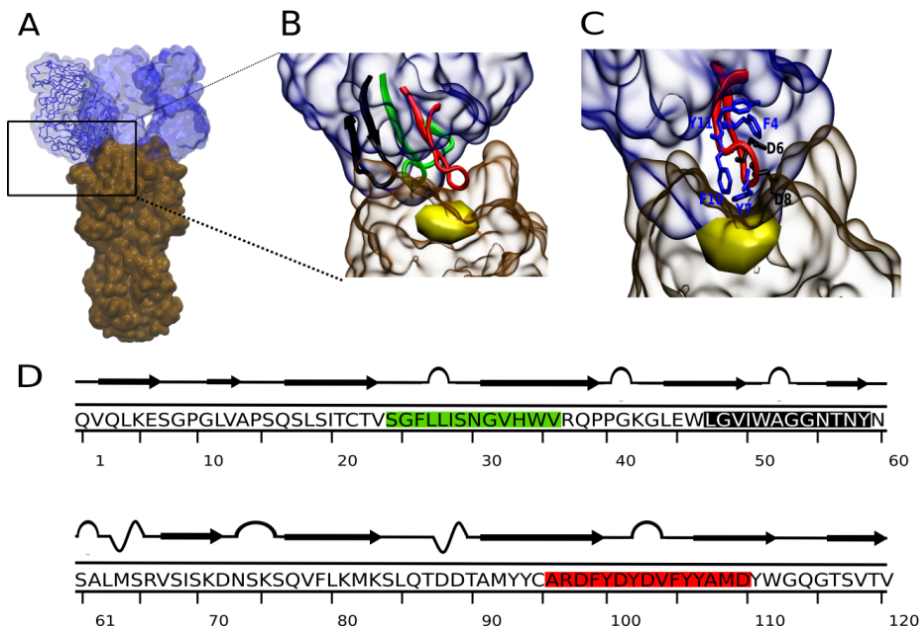


Abbildung 10: Struktur des HC19-Antikörpers im Komplex mit der HA1-Domäne von A/X31 (H3N2). A) 3D-Struktur von drei Fab-Fragmenten (blau) gebunden an jeweils eine HA1-Domäne des homotrimeren HA-Proteins von A/X31 (H3N2) (braun). Die Kristallstrukturdaten des Komplexes befinden sich bei der Proteindatenbank (PDB) unter der Bezeichnung „2vir“. B) Vergrößerung in den Interaktionsbereich von Antikörper und HA1. Die für die Bindung relevanten Peptide aus dem Fab-Anteil sind in grün (PeA), rot (PeB) und schwarz (PeC) farblich hervorgehoben. C) PeB interagiert mit HA in der Nähe der SA-Bindetasche (gelb). Die für die Bindung förderlichen Aminosäuren sind in rot dargestellt und Aminosäuren, die weniger geeignet für eine Interaktion mit HA sind wurden, schwarz markiert. D) Primäre und sekundäre Struktur der schweren, variablen Kette des Fab-Fragments. Die aus dem Antikörper selektierten Peptide sind farblich hervorgehoben (vergleiche mit D). Abbildung 10 stammt aus einer Publikation von Memczak und Mitarbeitern ([Memczak, Lauster et al. 2016](#)).

SPR-Bindungsstudien mit HA aus A/X31 (H3N2) gegenüber peptidbeschichteten Oberflächen legten nahe, dass das Peptid PeB am stärksten an Viren bindet (siehe Abbildung 11 A). Daher wurde das Bindungsverhalten von PeB an HA1 genauer untersucht. Hierfür wurde zunächst mittels einer Moleküldynamik-(MD)-Simulation überprüft, ob das Peptid PeB auch frei von anderen Antikörperanteilen in der Lage ist, mit HA1 im Komplex zu verweilen. Dabei stellte sich heraus, dass der PeB-HA1-Komplex (Abbildung 11 B) über einen Simulationszeitraum von 10 ns stabil blieb. Für diese Interaktion ließ sich eine Änderung der freien Bindungsenthalpie von -20,4 kcal/mol errechnen. Hingegen zeigten HA1-Komplexe mit PeA eine Dissoziation und mit PeC eine geringere Änderung der freien Bindungsenthalpie, die -5,3 kcal/mol (Tabelle 13) betrug. Bei genauerer Betrachtung der interagierenden Aminosäuren erwiesen sich Asp6 (2,4 kcal/mol) und Asp9 (3,7 kcal/mol) als ungünstig für eine Interaktion mit HA1 (Abbildung 10 C). Die aromatischen Aminosäuren Phe4 (-0,6 kcal/mol), Tyr7 (-3,9 kcal/mol) und Phe10 (-3,0 kcal/mol) hingegen erwiesen sich als förderlich für eine Interaktion mit HA. Durch Austausch der für die Bindung benachteiligenden Aminosäuren durch Glycin an Position 6 und Phenylalanin an Position 9 konnte die Änderung der freien Bindungsenthalpie (ΔG) verringert werden

(Abbildung 11 C). MD-Simulationen mit dieser als PeB^{GF} bezeichneten Doppelmutante, formierten innerhalb des Simulationszeitraums ebenfalls einen stabilen Komplex mit HA1 (Abbildung 11 B).

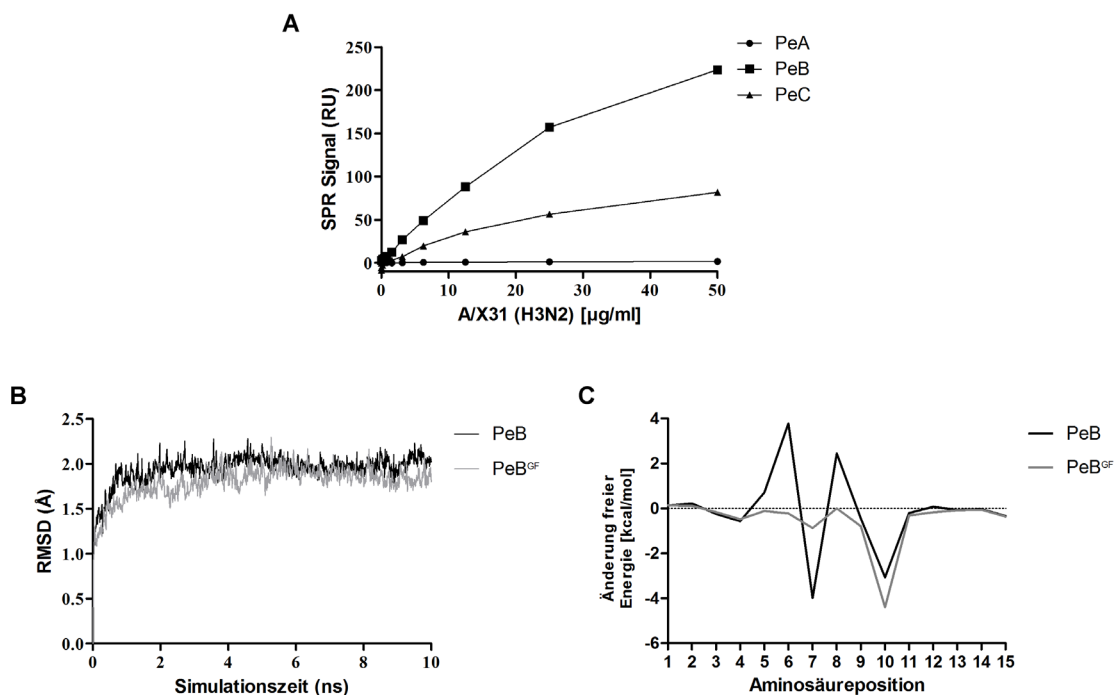


Abbildung 11: Bindung von Influenza A/X31 (H3N2) an Antikörperpeptide und *in silico* Charakterisierung von PeB- bzw. PeB^{GF}-HA1-Komplexen. A) SPR-Messungen mit verschiedenen Konzentrationen an A/X31 (H3N2) Viren gegenüber mit Peptid funktionalisierte Goldoberflächen. PeA-Lys (0,77 pmol/mm²), PeB-Lys (0,57 pmol/mm²) und PeC-Lys (1,93 pmol/mm²). Dargestellt ist das SPR-Signal 10 s nach Injektion verschiedener Viruskonzentrationen. B) Zeitliche Entwicklung der mittleren quadratischen Abweichung (engl. *root mean square deviation*, RMSD) von Rückgratatomen, ausgehend von der ursprünglichen Konfiguration von A/X31 (H3N2) im Komplex mit PeB (schwarz) oder PeB^{GF} (grau). Die flexiblen N- und C-Termini wurden von der Simulation ausgeschlossen. C) Energiebeitrag individueller Aminosäurereste von PeB (schwarz) und PeB^{GF} (grau) zur gesamten Änderung der freien Bindungsenthalpie. Die in Abbildung A dargestellten Messungen wurde von Dr. Memczak (IZI Fraunhofer, Golm) und die in den Abbildungen B und C dargestellten Messungen wurden von Dr. Di Lella (HU Berlin) im Rahmen einer Kooperation erstellt ([Memczak, Lauster et al. 2016](#)).

Tabelle 13: Freie Bindungsenthalpien der Peptide PeA, PeB und PeC bei der Interaktion mit HA aus A/X31 (H3N2). Errechnete Werte für die freie Bindungsenthalpie aus MD-Simulationen (10 ns) mit Peptid-HA1-Komplexen. Die CDR-Sequenzanteile wurden unterstrichen.

Peptid	Sequenz	ΔG [kcal/mol]
PeA	SGFLLIS <u>NG</u> VH MV	Dissoziation
PeB	ARDFYDYDVFY <u>Y</u> AMD	-20,4
PeC	LGVIW <u>AGG</u> NTNY	-5,3

4.1.2 Untersuchung des Bindungsinhibitionspotentials ausgewählter, monovalenter IAV-Binder

Zur Bestimmung des Bindungsinhibitionspotentials einiger bekannter HA-Binder und den Peptiden PeB, PeB^{GF} und PeB^P wurden verschiedene Bindungskompetitionsexperimente durchgeführt. Zunächst wurden die Peptide in einem Hämagglutinationsinhibitions-(HAI)-Test mit humanen Erythrozyten und A/X31 (H3N2) untersucht. Zum Vergleich wurden die beiden Trisaccharide α -2,6-Sialyllactose (α -2,6-SL) und α -2,6-Sialyllactose-N-acetylamin (α -2,6-SLN), die an humanpathogene IAV-Stämme binden und α -2,3-Sialyllactose (α -2,3-SL), welches an aviärpathogene Stämme bindet, in den HAI-Test miteinbezogen. Für α -2,6-SL und α -2,6-SLN konnten dabei schwache Hämagglutinationsinhibitionskonstanten (KiHAI) von 50 mM bzw. 60 mM bestimmt werden (Abbildung 12 A, Tabelle 14). Das Trisaccharid α -2,3-SL hingegen zeigte bis zu einer getesteten Konzentration von 50 mM keine Inhibition gegenüber dem humanpathogenen Serotyp A/X31 (H3N2).

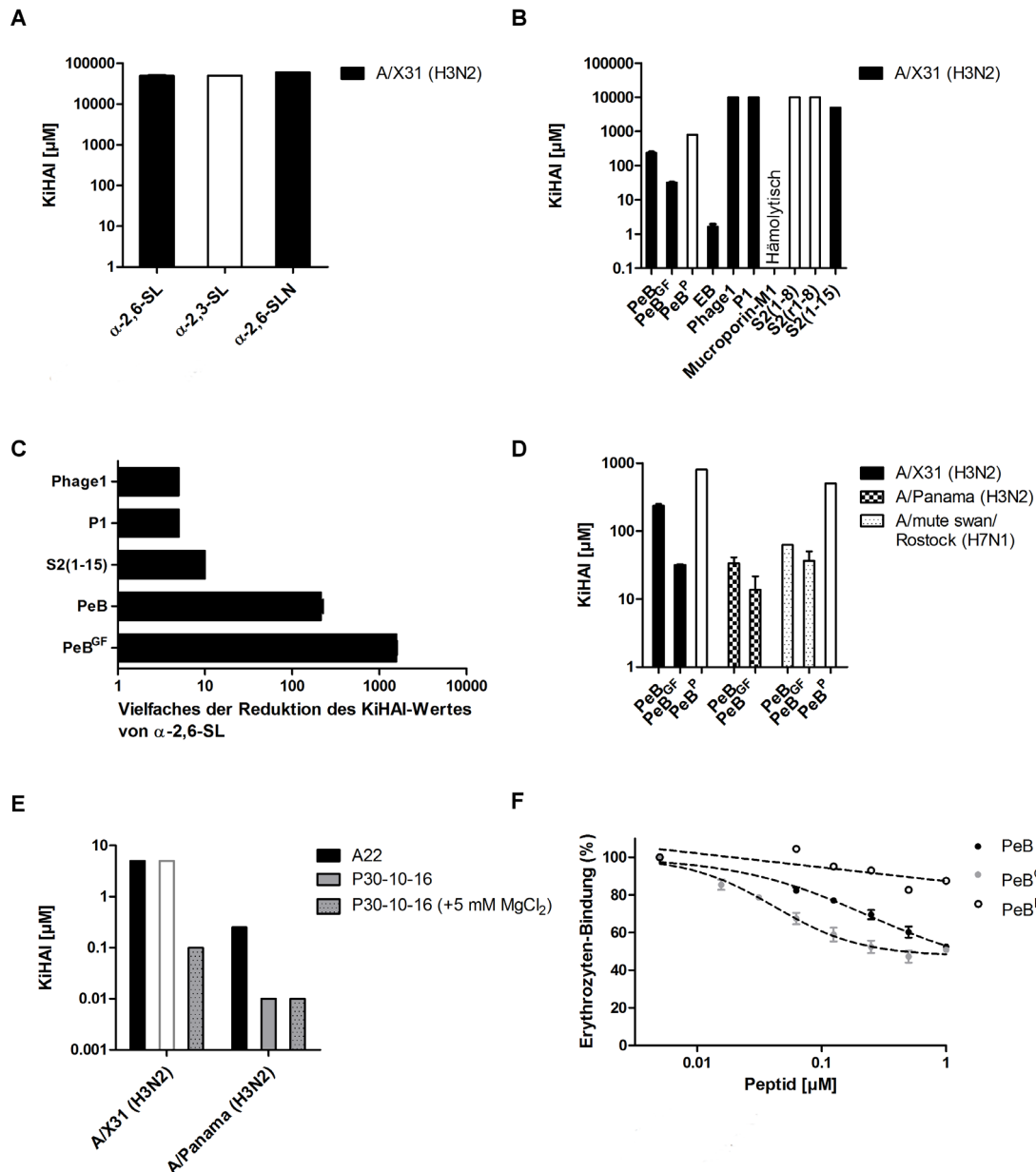


Abbildung 12: Inhibition der Bindung von IAV an humane Erythrozyten. A) KiHAI aus Experimenten mit verschiedenen Trisacchariden gegenüber 2 HAU A/X31 (H3N2) (N=3). B) KiHAI-Werte verschiedener bekannter Peptide (EB, Phage 1, P1, Mucroporin-M1, S2(1-8), S2(r1-8), S2(1-15)) und die in der vorliegenden Arbeit neu entwickelten Peptide (PeB, PeB^{GF}, PeB^P) gegenüber 2 HAU A/X31 (H3N2). Mucroporin-M1 erwies sich als stark hämolytisch, weswegen kein Inhibitionswert ermittelt werden konnte. C) Vielfaches der KiHAI-Wert Reduktion der dargestellten Peptide im Vergleich zu α-2,6-SL. D) Vergleich von PeB, PeB^{GF} und PeB^P gegenüber den humanpathogenen IAV-Stämmen A/X31 (H3N2) und A/Panama (H3N2), sowie dem aviären Stamm A/mute swan/Rostock (H7N1 LP). E) Ermittelte KiHAI-Werte der bekannten DNA- (A22) und RNA-Aptameren (P30-10-16) gegenüber 2 HAU A/X31 (H3N2) und A/Panama (H3N2). Messungen mit dem RNA Aptamer wurden in Gegenwart oder Abwesenheit von 5 mM MgCl₂ durchgeführt (N=2). F) Inhibition der Erythrozytenbindung von R18-markierten A/X31 (H3N2) Viren (16 HAU/µl) durch PeB, PeB^{GF} und dem Kontrollpeptid PeB^P. Die Datenpunkte wurden mit einer 4-parametrischen, logarithmischen Funktion angepasst. Die daraus resultierenden IC₅₀-Werte sind in Tabelle 14 aufgelistet. Mit Ausnahme von Abbildung E verweisen die Fehlerbalken in Abbildung 12 auf den Standardfehler des Mittelwerts (SEM) (N≥3). Die weißen Säulen in Abbildung A, B, D, und E zeigen die maximal eingesetzte Inhi-

bitorkonzentration ohne messbare Hemmung der Hämagglutination. Alle KiHAI-Werte sind in Tabelle 14 und 15 dargestellt.

Als Alternative zu den schwach affinen Sialosiden konnten monovalente Peptide gegenüber HA ein weit höheres Hämagglutinationsinhibitionspotential erreichen (Abbildung 12 B, Tabelle 14). Mit Ausnahme von Peptid S2, das als Sialomimetikum für eine Bindung in die SA-Bindetasche von HA entwickelt wurde, liegen die Interaktionsstellen der anderen untersuchten Peptide außerhalb der SA-Bindetasche ([Matsubara, Onishi et al. 2010](#)). Unter den für diese Studie ausgewählten Peptiden befanden sich folgende Kandidaten: Die Peptide L-P1 und P1, die aus einer Phagedisplayselektion von Peptidbindern gegenüber HA aus A/chicken/Iran (H9N2) bzw. A/goose/Jilin (H5N1) hervorgehen ([Rajik, Omar et al. 2009](#), [Wu, Li et al. 2011](#)), das peptidogene Sialomimetikum S2(1-15) und dessen kürzere Variante S2(1-8), sowie ein korrespondierendes Kontrollpeptid mit der umgekehrten Aminosäuresequenz S2(r1-8) ([Matsubara, Onishi et al. 2010](#)), das aus einem Skorpionsgift abgeleitete Mucroporin-M1 ([Li, Zhao et al. 2011](#)), der sogenannte „Entry Blocker“ (EB) ([Jones, Turpin et al. 2006](#)) und schließlich die Antikörperpeptide PeB, PeB^{GF} und PeB^P (Abschnitt 4.1.1).

Die beiden Peptide aus dem Phagedisplay wiesen mit einem KiHAI-Wert von 10 mM sehr geringe Inhibitionswerte gegenüber A/X31 (H3N2) auf (Abbildung 12 B und Tabelle 14). Unter den Sialomimetika war lediglich die längere Peptidvariante S2(1-15) (KiHAI= 5 mM) in der Lage eine viral induzierte Hämagglutination zu hemmen. Mucroporin-M1 konnte aufgrund eines stark hämolytischen Charakters in HAI-Tests nicht eingesetzt werden. Das Peptid EB hingegen zeigte gegenüber A/X31 (H3N2) sehr geringe Inhibitionswerte im niedrigen mikromolaren Bereich. Für PeB und PeB^{GF} konnten ebenfalls mikromolare KiHAI-Werte ermittelt werden. Das Kontrollpeptid PeB^P führte selbst bei einer getesteten Konzentration von 800 µM zu keiner HAI (Abbildung 12 B). Im Vergleich zu dem KiHAI-Wert für α-2,6-SL konnten für die beiden Peptide PeB und PeB^{GF} ca. 200- bzw. 2.000-fach geringere Inhibitionswerte bestimmt werden (Abbildung 12 C). Da sich EB im weiteren Verlauf dieses Kapitels als ein multivalenter Binder herausstellen wird (Abbildung 14), wurde dieses Peptid nicht für einen Vergleich mit anderen monovalenten Bindern miteinbezogen. Die Peptide PeB und PeB^{GF} stellten sich demzufolge als die besten monovalenten Bindungsinhibitoren in HAI-Experimenten mit A/X31 (H3N2) Viren heraus.

Tabelle 14: Hämagglutinations- und Bindungsinhibitionswerte ausgewählter monovalenter Rezeptoren. Dargestellt sind IC₅₀-Werte aus SPR basierten Bindungskompetitionsexperimenten mit dem logarithmischen Standardfehler, der halb maximalen InhibitorKonzentration (SE logIC₅₀), KiHAI-Werte aus HAI-Experimenten mit dem SEM und IC₅₀-Werte aus Zellbindungsinhibitionsstudien mit dem SE logIC₅₀. Nicht bestimmte (n.b.) Inhibitionswerte sind entsprechend gekennzeichnet und solche Messungen, die keine messbare Inhibition verursachten, wurden mit einem Minus (-) versehen.

	Substanz	SPR IC ₅₀ [μM]	HAI KiHAI [μM]	Zellbindung IC ₅₀ [μM]
Zucker	α-2,6-SL	902 (58)	50000	>4000
	α-2,3-SL	5242 (63)	>50000	n.b.
	α-2,6-SLN	n.b.	60000	n.b.
Peptide	S2(1-8)	3798 (136)	>10000	n.b.
	S2(r1-8)	n.b.	-	n.b.
	S2(1-15)	2862 (223)	5000	n.b.
	PeB	75 (13)	235 (±15)	235 (0,2)
	PeB ^{GF}	13 (3)	32 (±1)	42 (0,1)
	PeB ^P	n.b.	-	-
	P1	4841 (194)	10000	n.b.
	L-P1	2653 (24)	10000	n.b.
	Mucroporin-M1	Interferenz	Hämolytisch	n.b.
	EB	Interferenz	1,6 (±0,3)	n.b.
Aptamere	A22 (DNA)	0,8 (0,3)	8	n.b.
	DNA-Kontrolle	-	-	n.b.
	P30-10-16 (RNA)	0,007 (0,7)	0,1*	n.b.
	RNA-Kontrolle	-	-	n.b.

*In Gegenwart von 5 mM MgCl₂

Zur weiteren Untersuchung des Inhibitionspotentials von PeB und PeB^{GF} wurden als nächstes weitere IAV-Stämme für HAI-Messungen hinzugezogen (Abbildung 12 D). Da der Antikörper aus dem das Wildtyp-Peptid PeB abgeleitet ist und am hochkonservierten Rand der SA-Bindetasche von HA bindet, wird eine breitneutralisierende Eigenschaften der Peptide vermuten. Um dies zu überprüfen, wurden die Peptide gegenüber den IAV-Stämmen A/Panama (H3N2) und A/mute swan/Rostock (H7N1) im HAI-Test untersucht. Gegen A/Panama (H3N2) konnten KiHAI-Werte von 33 μM für PeB und 14 μM für PeB^{GF} bestimmt werden (Tabelle 15). Der phylogenetisch entfernt verwandte H7N1-Stammvertreter A/mute swan/Rostock (H7N1) zeigte KiHAI-Werte von 63 μM für PeB und von 23 μM für PeB^{GF}. Das Kontrollpeptid PeB^P konnte keine Hämagglutinationsinhibition herbeiführte.

Neben Peptiden und Zuckern wurden auch bekannte Aptamere, für die gegen IAV-Stämme des Typs H3N2 hohe Affinitätswerte bestimmt werden konnten, in die vorliegende Arbeit miteinbezogen. Zum Vergleich mit den anderen HA-Binderklassen wurden das DNA-Aptamer A22 und das RNA-Aptamer P30-10-16 für HAI-Experimente herangezogen ([Jeon, Kayhan et al. 2004](#),

[Gopinath, Misono *et al.* 2006](#)). Dabei stellte sich heraus, dass A22 und P30-10-16 in der Lage waren, A/X31 (H3N2) mit KiHAI-Werten von 8 μM bzw. 100 nM im HAI-Test zu inhibieren (Abbildung 12 E und Tabelle 14). Das RNA-Aptamer konnte nur in Gegenwart von 5 mM MgCl_2 eine antivirale Aktivität verursachen. Gegenüber A/Panama (H3N2) konnten KiHAI-Werte von 250 nM mit A22 und 10 nM mit P30-10-16 ermittelt werden (Tabelle 15). Im Falle des RNA-Aptamers hatte ein Zusatz von 5 mM MgCl_2 keinen Einfluss auf die Inhibitionswerte. (Abbildung 12 E und Tabelle 14).

Tabelle 15: HAI-Test mit Antikörperpeptiden und Aptameren gegenüber A/Panama (H3N2) und A/mute swan/Rostock (H7N1). Darstellung der Mittelwerte gemessener KiHAI-Werte mit dem SEM ($N \geq 3$). Experimente, die keine Inhibition zeigten, wurden entsprechend markiert (-). n.b.= nicht bestimmt.

IAV-Stamm	KiHAI (μM)				
	PeB	PeB ^{GF}	PeB ^P	A22	P30-10-16
A/Panama (H3N2)	33 \pm 8	14 \pm 9	-	0,25 \pm 0	0,01 \pm 0*
A/mute swan/ Rostock (H7N1)	63 \pm 0	23 \pm 6	-	n.b.	n.b.

*Mit und ohne Zusatz von 5 mM MgCl_2

Neben dem HAI-Test wurden zudem zwei weitere Testverfahren zur Ermittlung des Inhibitionscharakters der monovalenten Binder durchgeführt:

Mit den Peptiden PeB, PeB^{GF} und PeB^P wurde ein Zellbindungsinhibitionstest mit R18-fluoreszenzmarkierten A/X31 (H3N2) Viren durchgeführt (Abschnitt 3.2.12). Viren, die mit dem Wildtypepeptid PeB oder der Doppelmutante PeB^{GF} für 30 min bei RT vorbehandelt wurden, verursachten eine konzentrationsabhängige Bindungshemmung an humane Erythrozyten (Abbildung 12 F). Für PeB und PeB^{GF} ließen sich hierbei IC_{50} -Werte von 235 μM bzw. 42 μM bestimmen (Tabelle 14). Das Kontrollpeptid PeB^P hingegen zeigte keine Hemmung der Virusbindung an Zellen. Die IC_{50} -Werte für PeB und PeB^{GF} liegen den KiHAI-Werten aus HAI-Experimenten sehr nahe, jedoch konnte keine vollständige Inhibition der Zellbindung erreicht werden (Abbildung 12 F).

Zur Validierung der Resultate aus zellbasierten Konkurrenzexperimenten wurde ein weiterer zellfreier Bindungstest zur Untersuchung der Peptide durchgeführt. Hierbei wurde mittels der Oberflächenplasmonresonanz (SPR) Spektroskopie die relative Virusbindung an α -2,6-SL funktionalisierte Oberflächen in Abhängigkeit der Inhibitorkonzentration bestimmt (Abbildung 13).

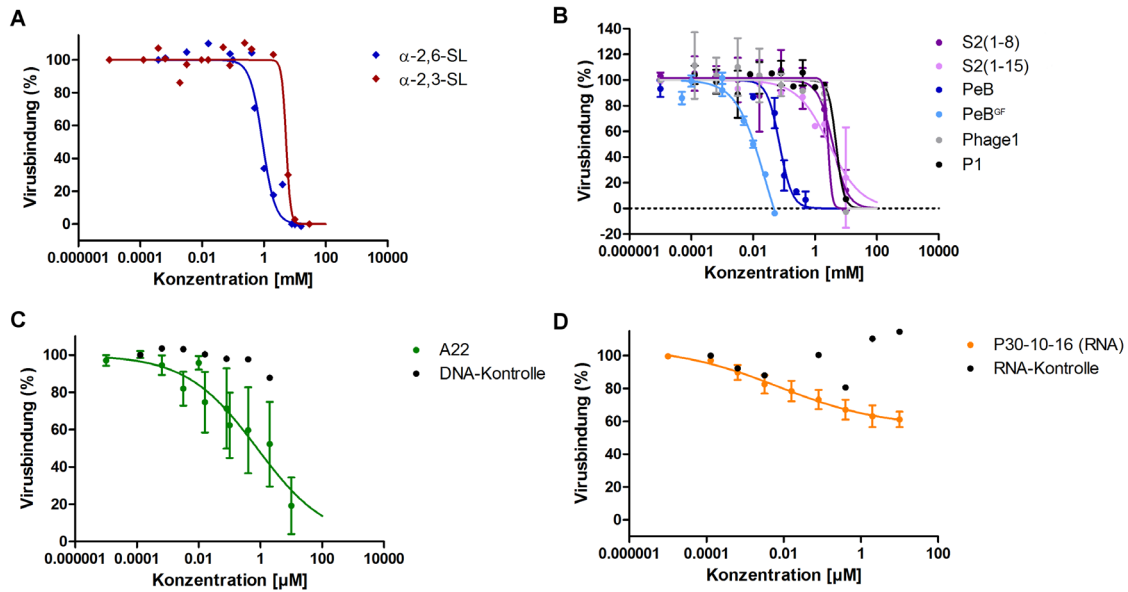


Abbildung 13: SPR basierter Bindungsinhibitionstest mit monovalenten Bindern. Relative Bindung von A/X31 (H3N2) an α -2,6-SL beschichtete Oberflächen in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen an A) α -2,6-SL, α -2,3-SL, B) den Peptiden S2(1-8), S2(1-15), PeB, PeB^{GF}, L-P1 und P1, sowie den Aptameren C) A22 und D) P30-10-16. Dargestellt sind Mittelwerte mit dem SEM ($N \geq 2$). Datenpunkte wurden mit einer 4-parametrischen, logarithmischen Funktion angepasst. Daraus resultierte IC₅₀-Werte sind in Tabelle 14 aufgelistet.

Die beiden Zucker α -2,6-SL und α -2,3-SL konnten eine Bindung von A/X31 (H3N2) im millimolaren Bereich hemmen, wie die IC₅₀-Werte darlegen (Abbildung 13 A und Tabelle 14). Die Peptide S2, P1 und L-P1 erwiesen sich mit Inhibitionskonstanten im millimolaren Bereich auch in diesem Testverfahren als schwache Bindungsinhibitoren (Abbildung 13 B und Tabelle 14). Die Peptide PeB und PeB^{GF} hingegen zeigten mit IC₅₀-Werten von 75 μ M respektive 13 μ M deutlich stärkere Inhibitionseffekte gegenüber den anderen Peptiden. Für Mucroporin-M1 konnten keine Inhibitionswerte bestimmt werden, da es in SPR-Messungen die Oberfläche verwendeter Goldchips irreversibel schädigte. Auch aus Messungen mit dem „Entry Blocker“ (EB) konnten keine Inhibitionswerte extrahiert werden, da sich herausstellte, dass das Peptid mit absteigender Konzentration weniger stark mit dem Sensorchip interagierte (Abbildung 14). Bei Betrachtung der Signalkurven stellte sich heraus, dass der abrupte Sprung ab einer Konzentration von ca. 0,1 μ M auch bei Messungen ohne Virus zu beobachten war. Das DNA-Aptamer A22 und das RNA-Aptamer P30-10-16 zeigten mit IC₅₀ Werten von 800 nM bzw. 7 nM bessere Bindungsinhibitionswerte als im HAI-Test (Abbildung 13 C, D und Tabelle 15). Jedoch war es mit dem RNA-Aptamer nicht möglich, eine vollständige Inhibition zu erreichen. Kontrollaptamere beider Nukleinsäurevarianten beeinflussten die Virusbindung nicht.

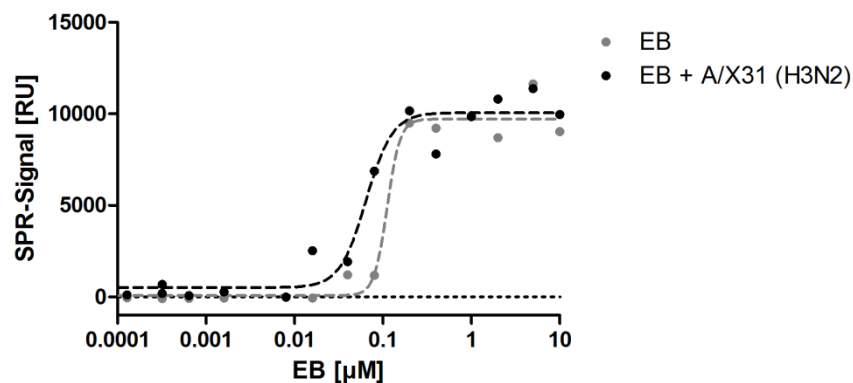


Abbildung 14: SPR-Signal in Abhängigkeit der EB-Peptidkonzentration. Dargestellt sind Mittelwerte des SPR-Signals der Messfließzelle aus Messungen mit unterschiedlichen Konzentrationen an EB in Gegenwart oder Abwesenheit einer konstanten Menge an A/X31 (H3N2). Die Datenpunkte wurden mit einer 4-parametrischen, logarithmischen Funktion angepasst.

Zusammengefasst erwiesen sich die Antikörperpeptide PeB und PeB^{GF} in drei verschiedenen Bindungsexperimenten als die effektivsten peptidbasierten Inhibitoren. Für die beiden untersuchten Aptamere konnten nanomolare Inhibitionswerte bestimmt werden, womit sie die affinsten HA-Rezeptoren unter allen getesteten Molekülen repräsentieren. Die anderen untersuchten Binder zeigten nur eine schwache Bindungsinhibition oder einen lytischen (Mucroporin-M1) oder multimerisierenden (EB) Charakter.

Damit eignen sich die Antikörperpeptide und die Aptamere als affinere Alternative im Vergleich zu dem natürlichen HA-Rezeptor α -2,6-SL.

4.1.3 Untersuchung viraler Fusionsinhibition mit monovalenten HA-Bindern

Zur Untersuchung des Inhibitionspotentials viraler Fusion durch Inhibitoren wurde ein fluoreszenzbasierter Dequenching (engl. *Auslöschung*)-Test oder ein Hämolyseinhibitionstest durchgeführt. Beim Dequenching-Test wurden A/X31 (H3N2)-Viren mit dem lipophilen Fluorophor R18 markiert. Die Konzentration an R18 wurde so gewählt, dass eine Selbstlöschung der Fluoreszenz auftrat. Die pH-abhängige, durch HA-vermittelte Fusion der Viren wurde in diesem Fall mit Erythrozytenmembranen (in der Fachsprache „Ghosts“ genannt) als Modellmembran zeitabhängig durch eine Aufhebung der Selbstlöschung verfolgt. Der Verlauf der Fusionskinetik wurde fluoreszenzspektroskopisch aufgenommen.

Bevor A/X31 (H3N2) Viren für das pH-getriggerte Fusionsexperiment mit Ghosts vermengt wurden, wurden die Viren mit unterschiedlichen Konzentrationen verschiedener Virusbinder inkubiert. Aus Experimenten mit dem DNA-Aptamer A22 und dem DNA-Aptamer P30-10-16 konnten hierbei die Fusionseffizienz mit IC₅₀-Wert von 8 µM bzw. 0,2 µM stark reduziert werden. Die beiden Peptide PeB und PeB^{GF} zeigten mit IC₅₀-Werten von 3,4 mM (PeB) und

1,5 mM (PeB^{GF}) geringere Inhibitionswerte. Das peptidische Sialomimetikum S2(1-15) konnte selbst bei einer Peptidkonzentration von 4 mM die virale Fusionseffizienz lediglich um 30 % reduzieren. Einen Einfluss auf die Fusionskinetik, welches sich anhand einer Änderung der Kurvensteigung widerspiegeln würde, konnte für die untersuchten Inhibitoren nicht beobachtet werden.

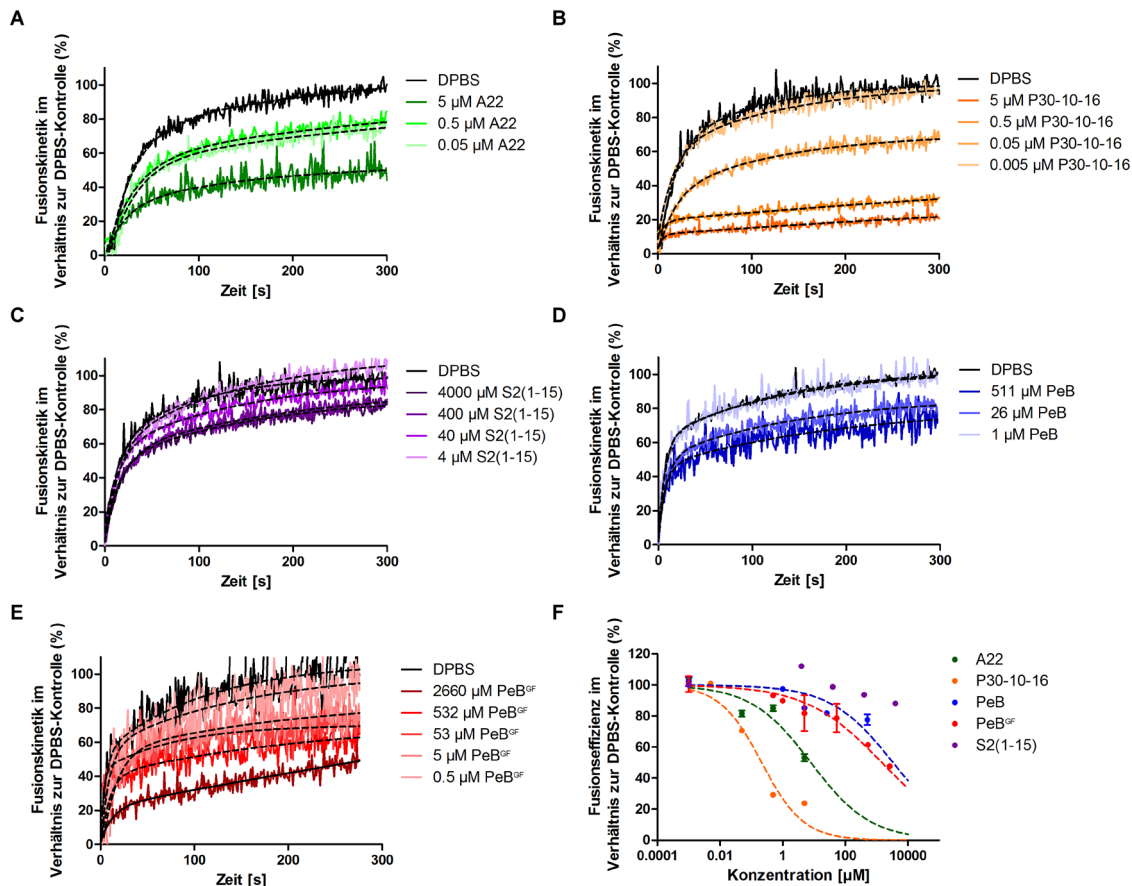


Abbildung 15: Fusionskinetik in Gegenwart verschiedener monovalenter Virusbinder. Fluoreszenzspektroskopische Aufnahme der pH-getriggerten Fusionskinetik mit Ghosts ($T = 37^{\circ}\text{C}$) nach Inkubation von A/X31 (H3N2) Viren mit unterschiedlichen Konzentrationen und A) DNA-Aptamer A22, B) RNA-Aptamer P30-10-16 und den Peptiden C) S2(1-15), D) PeB und E) PeB^{GF} F) Darstellung der viralen Fusionseffizienz bei unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen. Die Fehlerbalken zeigen den SEM ($N=2$). IC_{50} -Werte aus einer nichtlinearen Regression sind in Tabelle 16 dargestellt.

Zur weiteren Untersuchung der viralen Fusionsinhibition der Antikörperpeptide PeB und PeB^{GF} wurde außerdem ein Hämolyseinhibitionstest durchgeführt (Abschnitt 3.2.13). Im Gegensatz zu dem Fluoreszenzlöschungsversuch wird hier nur das Ausmaß der Fusionseffizienz anhand der Freisetzung von Hämoglobin nach einer pH-abhängigen Fusion von Viren mit Erythrozyten detektiert.

Durch Vorinkubation von A/X31 (H3N2) Viren mit PeB oder PeB^{GF} konnte eine virusverursachte Hämolyse mit IC_{50} -Werten von 306 μM bzw. 74 μM bestimmt werden (Abbildung 16

und Tabelle 16). Damit konnten in Hämolyseinhibitionsversuchen geringere Inhibitionswerte bestimmt werden als in Fusionsexperimenten.

Tabelle 16: Fusions- und Hämolyseinhibitionswerte monovalenter Binder gegenüber A/X31 (H3N2). Aufgelistet sind IC_{50} -Werte aus einer 4-parametrischen, logarithmischen Kurvenanpassung der Datenpunkte aus Abbildung 15 F und 16. In Klammern ist der SE $\log IC_{50}$ dargestellt. n.b.= nicht bestimmt. (-) = keine Inhibition.

	Substanz	Fusions- inhibition IC_{50} [μ M]	Hämolyse- inhibition IC_{50} [μ M]
Peptide	S2(1-15)	-	n.b.
	PeB	3363 (0,4)	306 (0,1)
	PeB ^{GF}	1476 (0,2)	74 (0,1)
	PeB ^P	n.b.	-
Aptamere	A22 (DNA)	8 (0,3)	n.b.
	P30-10-16 (RNA)	0,2 (0,2)	n.b.

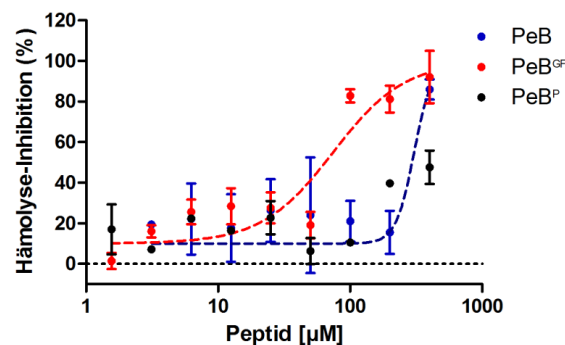


Abbildung 16: Inhibition virusbedingter Hämolyse mit Antikörperpeptiden. Titrationsexperimente mit antiviralen Peptiden zur Bestimmung der Inhibition von Hämolyse. Dargestellt sind Mittelwerte relativ zur inhibitorfreien, virusinduzierten Hämolyse. Die Fehlerbalken zeigen den SEM (N=3). Experimente wurden bei 37°C durchgeführt.

Zusammenfassend lässt sich aus den Fusionsinhibitionsmessungen schlussfolgern, dass die getesteten Substanzen das Ausmaß der Fusionseffizienz herabsetzen konnten. Der zeitliche Verlauf der Fusion blieb dabei unverändert. Demzufolge kann von einer Wechselwirkung der Peptide mit der Fusionsdomäne HA2 abgesehen werden. In Anlehnung an die Ergebnisse aus den Bindungsexperimenten (Abschnitt 4.1.2), weisen die untersuchten Peptide und Aptamere nur auf das Vorliegen einer Interaktion mit der für die Zellbindung relevanten HA1-Domäne hin.

4.1.4 Hemmung von IAV-Infektion mit Antikörperpeptiden

Für die Quantifizierung viraler Infektionsinhibition wurden Zellviabilitäts- und Mikroneutralisationstests durchgeführt. Für die Ermittlung von Zellviabilität bzw. der von Influenzaviren verursachten Zytotoxigenität wurde für die untersuchten monovalenten Binder mit dem Tetrazoliumsalz MTS durchgeführt (Abschnitt 3.2.17). Im Folgenden wurden lediglich die Antikörperpeptide PeB, PeB^{GF} und PeB^P auf ein antivirales Potential in Infektionsexperimenten untersucht (Abbildung 17).

Zunächst wurden die Peptide auf Zytotoxizität gegenüber MDCK-II Zellen getestet. Dabei konnte festgestellt werden, dass PeB, PeB^{GF}, sowie das Kontrollpeptid PeB^P keine Zytotoxizität unterhalb der maximalen getesteten Konzentration von 400 µM verursachten (Abbildung 17 A). Zur Bestimmung einer Infektionsinhibition durch die Peptide wurden A/X31 (H3N2) und A/mute swan/Rostock (H7N1) Viren (MOI 0,05) mit Peptidkonzentrationen bis 400 µM für 30 min vorinkubiert, bevor MDCK-II Zellen mit der Virus-Inhibitormischung für eine Stunde infiziert wurden. Danach wurden ungebundene Viren zusammen mit dem Inhibitor durch Waschen entfernt, und die Zellen wurden für weitere 24 h inkubiert, um eine Virusvermehrung zu erlauben. Am Ende des Experiments wurde ein MTS-Reagenz zur Bestimmung der Zellviabilität bzw. virusbedingter Zytotoxigenität hinzugefügt.

In Infektionsexperimenten mit A/X31 (H3N2) und A/mute swan/Rostock (H7N1) konnten für das Wildtyp-Peptid PeB und für die Doppelmutante PeB^{GF} mikromolare IC₅₀-Werte bestimmt werden (Abbildung 17 B, C und Tabelle 17). Für das Kontrollpeptid PeB^P war keine Infektionsinhibition nachweisbar.

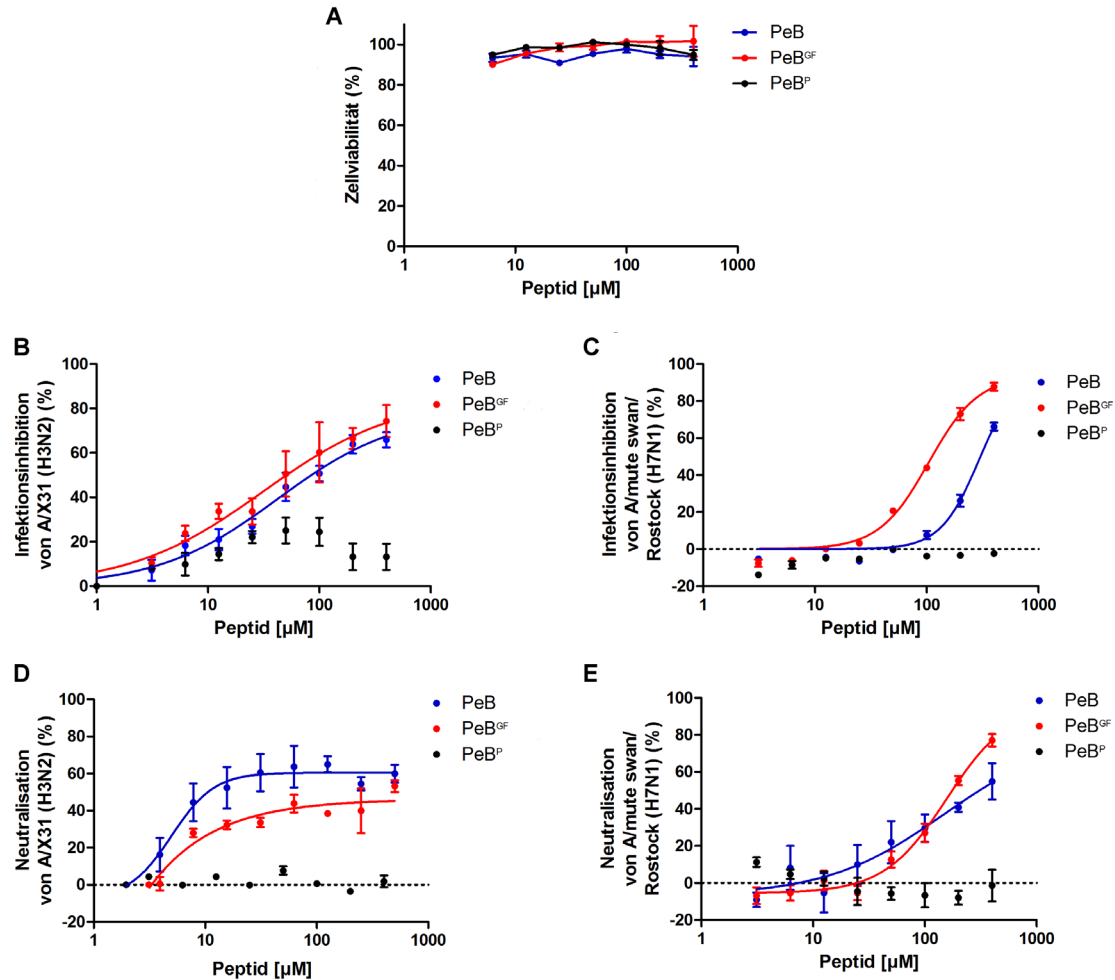


Abbildung 17: Zellviabilitäts- und Infektionsinhibitionsmessungen mit den antiviralen Peptiden PeB, PeB^{GF} und PeB^P. A) Zellviabilität von MDCK-II Zellen 24 h nach Behandlung mit antiviralen Peptiden bei verschiedenen Konzentrationen. B) Infektionsinhibition von A/X31 (H3N2) und C) A/mute swan/Rostock (H7N1) mit PeB und PeB^{GF}. PeB^P diente als Kontrolle. D) Dosisabhängige Neutralisation von A/X31 (H3N2) und E) A/mute swan/Rostock (H7N1) durch antivirale Peptide. Zur Quantifizierung von Virusneutralisation wurde das Influenza NP^{IAV}-Level mittels eines Immunodetektionsverfahrens erfasst (Abschnitt 3.2.16). Fehlerbalken in Abbildung 17 zeigen den SEM (N≥3). Berechnete IC₅₀-Werte sind in Tabelle 18 aufgeführt.

Für den Nachweis einer Infektionsinhibition durch die Antikörperpeptide wurde ergänzend zu den Zellviabilitätsversuchen ein Mikroneutralisationstest verwendet. Diese Experimente wurden analog zu dem MTS-basierenden Testverfahren durchgeführt, jedoch wurde beim Mikroneutralisationstest zur Quantifizierung des antiviralen Potentials das Expressionsniveau des viralen Nukleoproteins 24 h nach Infektion mittels immunologischer Färbung detektiert.

Auch hier lagen die IC₅₀-Werte für PeB und PeB^{GF} in Experimenten mit den beiden IAV Stämmen A/X31 (H3N2) und A/mute swan/Rostock (H7N1) im mikromolaren Bereich. Das Kontrollpeptid PeB^P hatte unterhalb der maximalen getesteten Konzentration keinen Einfluss auf die Infektion (Abbildung 17 D und E). In beiden Infektionstests zeigten sich gegenüber A/X31

(H3N2) kein signifikanter Unterschied in der Infektionsinhibition zwischen PeB und PeB^{GF}. In Experimenten mit dem Virus A/mute swan/Rostock (H7N1) erwies sich jedoch PeB^{GF} in beiden Testverfahren doppelt so effektiv wie PeB.

Tabelle 17: Inhibitionswerte aus Infektionshemmungs- und Mikroneutralisationstests mit antiviralen Antikörper-Peptiden. Gezeigt sind IC₅₀-Werte aus Messungen der Peptide PeB und PeB^{GF} mit dem SE logIC₅₀. (-) = keine Inhibition.

IAV-Stamm	Infektionshemmung			Mikroneutralisation		
	IC ₅₀ [μM]			IC ₅₀ [μM]		
	PeB	PeB ^{GF}	PeB ^P	PeB	PeB ^{GF}	PeB ^P
A/X31 (H3N2)	32 ± 5	25 ± 6	-	6 ± 1	7 ± 1	-
A/mute swan/ Rostock (H7N1)	216 ± 11	94 ± 6	-	177 ± 6	96 ± 14	-

Zusammenfassend konnte für die Antikörperpeptide PeB und PeB^{GF} in zwei verschiedenen Testverfahren ein Infektionsinhibitionspotential im mikromolaren Konzentrationsbereich gegenüber A/X31 (H3N2) und /mute swan/Rostock (H7N1) nachgewiesen werden.

4.2 Untersuchung der Bindungskinetik von IAV an multivalenten Oberflächen

Im bisherigen Verlauf der Arbeit wurden unterschiedliche Rezeptorklassen von Zuckern über Peptide bis hin zu Aptameren als monovalente Inhibitoren gegenüber Influenzaviren charakterisiert. In dieser Reihenfolge verhält es sich auch mit dem Bindungsinhibitionspotential gegenüber A/X31 (H3N2), welches von Zuckern bis zu den Aptameren zunimmt. An diesem Punkt stellt sich die Frage, ob mit diesen Rezeptoren einen Multivalenzeffekt erzielt werden kann? Und wenn dies zuträfe, wie sich dieser bei den unterschiedlichen Rezeptorklassen im Ausmaß der maximalen Bindungsstärke unterscheiden würde?

Zur Beantwortung dieser Frage wurde ein experimentelles Vorgehen gewählt, bei dem die Rezeptoren α-2,6-SL, PeB oder A22 bei ähnlicher Rezeptordichte auf einem Goldchip immobilisiert wurden, um die Bindungskinetik von A/X31 (H3N2) an diese Oberflächen mittels SPR bestimmen und die Ergebnisse miteinander vergleichen zu können (Abbildung 18).

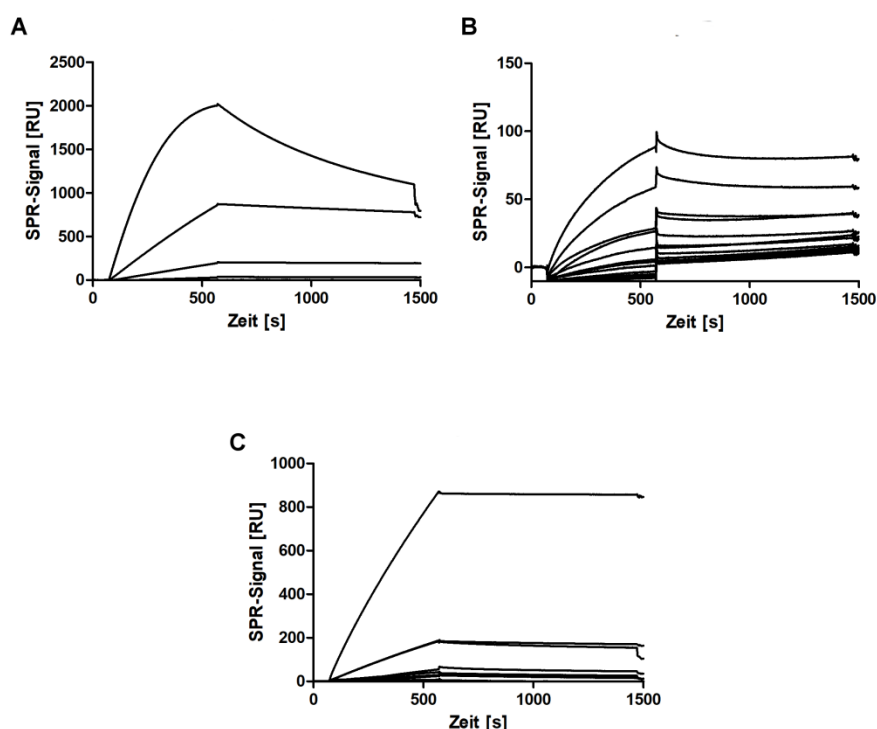


Abbildung 18: Bestimmung der Bindungskinetik von A/X31 (H3N2) Viren an unterschiedlich funktionalisierten Oberflächen. SPR-Messungen zur Ermittlung der Bindungskinetik von A/X31 (H3N2) an Oberflächen, die mit A) α -2,6-SL (312 fmol/mm²), B) PeB (256 fmol/mm²), oder C) A22 (89,6 fmol/mm²) beschichtet wurden. Die Mittelwerte aus den ermittelten Dissoziationsraten (k_{off}) bei unterschiedlichen Virusinjektionen sind in Tabelle 18 aufgeführt.

Assoziationsraten konnten aufgrund des limitierten Massentransports nicht ermittelt werden, weswegen auch kein Gleichgewichtszustand erreicht werden konnte. Aus diesem Grund wurden die Dissoziationsraten (k_{off}) aus Messung mit absteigenden Konzentrationen an A/X31 (H3N2) an den verschiedenen beschichteten Oberflächen miteinander verglichen (Tabelle 18). Hierbei ließ sich eine Abnahme der Dissoziationsraten von Viren an multivalenten Oberflächen in Abhängigkeit von der Affinität des monovalenten Binders beobachten. Influenzaviren, die mit A22 beschichteten Oberflächen interagierten, wiesen eine ca. 10-fach geringeren Dissoziationsrate auf als Viren, die mit α -2,6-SL beschichteten Oberflächen wechselwirkten. PeB beschichtete Substrate führten zu einer 3- bis 4-fach geringeren Dissoziationsrate bei der Ablösung der Viren von der Goldchipoberfläche.

Tabelle 18: Dissoziationsraten (k_{off}) von A/X31 (H3N2) an unterschiedlich funktionalisierten Oberflächen. Die Goldoberflächen wurden entweder mit α -2,6-SL, Peptid PeB oder DNA-Aptamer A22 beschichtet. Die bestimmten Werte für k_{off} beziehen sich auf Mittelwerte aus ermittelten Dissoziationsraten bei verschiedenen Virusinjektionen.

Beschichtung	k_{off} [1/s]
α -2,6-SL	$2,60 \cdot 10^{-4}$
PeB	$6,87 \cdot 10^{-4}$
A22	$1,67 \cdot 10^{-5}$

Rückblickend konnte gezeigt werden, dass sich in diesem Abschnitt neben α -2,6-SL auch PeB und A22 als Rezeptoren für eine multivalente Interaktion mit IAV eignen. Darüber hinaus zeigte sich anhand der Abnahme der Dissoziationsraten von α -2,6-SL über PeB bis A22, dass affinere monovalente Rezeptoren auch durch eine multivalente Präsentation länger mit IAV interagieren.

4.3 Statistische Rezeptor-Polyglycerolkonjugate als IAV-Inhibitoren

In diesem Kapitel werden zwei Rezeptor-Polyglycerolsysteme mit zufälliger Anordnung der Rezeptoren behandelt. Bei diesen Polymersystemen handelt es sich um multivalente Nanopartikel, die aus einem statistischen Reaktionsprozess zwischen Rezeptoren und Polyglycerolen hervorgehen. Der Funktionalisierungsgrad an SA auf den Polyglycerolsystemen kann über das Vereinigen eines bestimmten Mengenverhältnisses der Reaktionspartner oder durch eine zeitliche Limitierung der Reaktionszeit näherungsweise eingestellt werden. Dabei ist die Rezeptordichte, unter der Annahme einer statistischen Gleichverteilung von Rezeptoren auf dem Polymergerüst, annähernd homogen verteilt. Da die exakten Rezeptorabstände auf den Polymeren nicht bekannt und synthetische Polymerpartikel inhomogen in ihrer Größe (Polydispersität) und Struktur sind, können geeignete Binder gegen multivalente Zielstrukturen (in diesem Fall IAV) nur durch ein Screeningverfahren identifiziert werden.

Im folgenden Abschnitt (4.3.1) wurden dendritische und lineare Polyglycerolgerüste für eine multivalente Präsentation von Sialinsäure mit dem Ziel verwendet, eine optimale Rezeptordichte für eine effiziente Inhibition von IAV zu bestimmen. Neben der Rezeptordichte war in diesem Abschnitt auch die Gerüstgröße und -struktur (dendritisch oder linear) bei der Inhibition viraler Aktivität von Interesse.

Im darauf folgenden Abschnitt (4.3.2) wurden peptidfunktionalisierte Polyglycerole auf ihre antivirale Wirksamkeit gegenüber IAV untersucht. Auch hier galt es einen optimalen Funktionalisierungsgrad und eine geeignete Polymergröße zu identifizieren.

4.3.1 Rolle der Rezeptordichte und Gerüstmorphologie bei der Inhibition von IAV am Beispiel von Polyglycerolsialosiden

Wie im Abschnitt 4.2 skizziert, ist es durch eine multiple Rezeptorpräsentation möglich, eine Bindungsverstärkung von Viren an eine multivalente Oberfläche zu erzielen. Jedoch handelt es sich hierbei lediglich um eine Umsetzung des schon länger bekannten Multivalenzprinzips (siehe Abschnitt 1.3.1). Viele der bisher untersuchten multivalenten Influenzainhibitoren weisen zwar geringe Inhibitionskonstanten auf, sind jedoch aufgrund der Verursachung hoher Toxizität in ihrem Einsatz stark limitiert. Über den Aspekt der Biokompatibilität hinaus kann bisher nur

wenig über die Rolle der Größe, Rezeptorvalenz oder Geometrie bei der Inhibition von IAV ausgesagt werden.

Zur Untersuchung der Aspekte Rezeptorvalenz, Inhibitorgröße und -form wurden drei Polyglycerolklassen mit jeweils unterschiedlichen Sialinsäurevalenzen synthetisiert: Dendritische Polyglycerolsialoside (dPGSA) mit einem 10 kDa oder 500 kDa Polymerkern und lineare Polyglycerolsialoside mit einem Molekulargewicht für die unfunktionalisierte Polymerkette von 10 kDa (Abbildung 19).

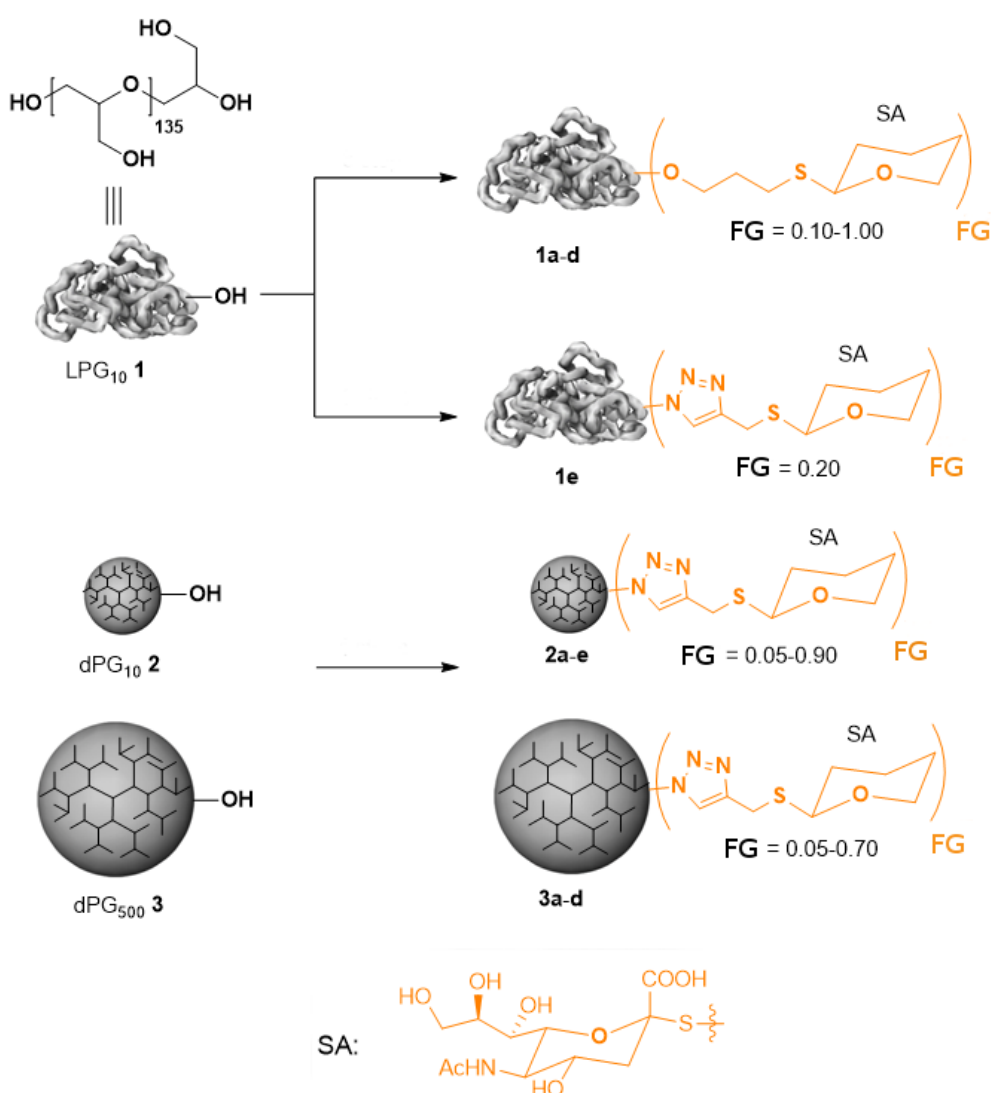


Abbildung 19: Schematische Darstellung der wichtigsten Synthesewege von linearen und dendritischen Polyglycerolsialosiden. Für Inhibitionsstudien wurden drei Polyglycerolklassen synthetisiert: Lineare Polyglycerole mit einem Molekulargewicht von 10 kDa (LPG₁₀ 1), dendritische Polyglycerole mit einem Molekulargewicht von 10 kDa (dPG₁₀ 2) oder 500 kDa (dPG₅₀₀ 3). Alle drei Polyglycerolklassen wurden mit unterschiedlichen Funktionalisierungsgraden an SA in einer zufälligen Verteilung auf dem Polymer versehen. Die Synthese der Polyglycerolsia-

loside (PGSA) wurde von Dr. Sumati Bhatia (FU Berlin) durchgeführt. Eine Übersicht aller PGSA-Varianten ist in Tabelle S1 gegeben. Die Abbildung wurde von Dr. Sumati Bhatia erstellt.

Zur Darstellung einer bestimmten Sialinsäurefunktionalisierung wurde ein bestimmtes stöchiometrisches Verhältnis an SA zu Polyglycerolen für eine chemische Reaktion vermengt. Die Prozentangaben für den Funktionalisierungsgrad (FG) an SA auf den Polymeren beziehen sich demzufolge auf den Anteil an Hydroxylgruppen, die zu SA-tragenden Gruppen konvertiert wurden. SA der dendritischen Polyglycerole (dPG) sind über einen Thiazolring auf dem Polymer und bei linearen Polyglycerolen (LPG) über einen Allyllinker immobilisiert. Mit diesen Linkern sind sie stabil gegenüber spontaner Hydrolyse und enzymatischem Abbau. Aufgrund der unterschiedlichen Linkerwahl bei linearen und dendritischen PG wurde ein weiteres lineares Polymer ($\text{LPG}_{10}\text{SA}_{0,2}$ **1e**) mit einem Triazollinker als Vergleich zu den Polymeren mit Allyllinkern synthetisiert, um den Einfluss des Linkers auf die Inhibition untersuchen zu können. Um einen inhibitorischen Effekt der Polymergerüste ausschließen zu können, wurden Polyglycerole ohne Sialinsäure für Kontrollzwecke herangezogen. Eine Übersicht über die untersuchten Polymerderivate sind Tabelle S1 zu entnehmen.

Zur Ermittlung der Inhibitionseffizienz wurde zunächst ein HAI-Test mit den Inhibitoren gegenüber A/X31 (H3N2) durchgeführt (Abbildung 20). Während nicht funktionalisierte Varianten der drei Polymersysteme keine Inhibition verursachten, zeigte sich unabhängig von der Größe der dendritischen Polyglycerolsialoside (PGSA) ein Optimum in der Inhibition bei einem FG mit SA zwischen 15-20 % (Abbildung 20 A).

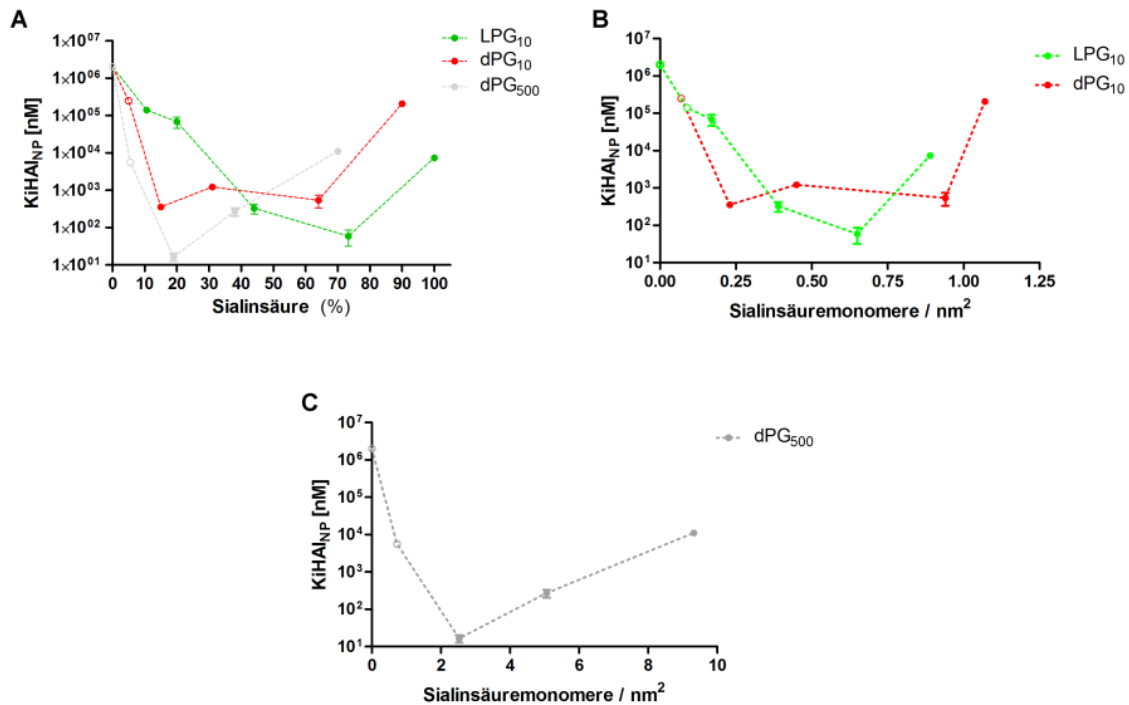


Abbildung 20: Hemmung von virusinduzierter Hämagglutination mit linearen und dendritischen Polyglycerolsialosiden mit unterschiedlicher SA-Funktionalisierung. KiHAI_{NP}-Werte aus HAI-Experimenten sind respektive der Nanopartikel (NP)-Konzentration abgebildet. A) Darstellung von Inhibitionswerten in Abhängigkeit der SA-Funktionalisierung auf verschiedenen PG-Polymeren. B) und C) illustrieren die Inhibitionswerte in Abhängigkeit von berechneten Sialinsäuredichten auf den Polymeren. Fehlerbalken zeigen den SEM (N≥3). Nicht gefüllte Kreise verweisen auf die maximal eingesetzte InhibitorKonzentration ohne messbare Hemmung von virusverursachter Hämagglutination. Alle bestimmten KiHAI-Werte sind den Tabellen 19 und S2 zu entnehmen.

Der Vertreter der dPG₅₀₀ Serie (dPG₅₀₀SA_{0.15} **3b**) in diesem Bereich war jedoch mit einem KiHAI_{NP} von 16 nM um einen 200-fachen Faktor effizienter als das kleinere Pendant (dPG₁₀SA_{0.15} **2b**) mit ähnlicher SA-Funktionalisierung (Tabelle 20). Die linearen Polyglycerole hingegen zeigten ein nach oben verschobenes Optimum (45-70 %) im FG an SA und erreichten KiHAI_{NP}-Werte von 59 nM (LPG₁₀SA_{0.70} **1c**) und 328 nM (LPG₁₀SA_{0.40} **1b**). Der Inhibitor dPG₅₀₀SA_{0.15} **3b** stellte sich damit als effektivster Bindungsinhibitor im HAI-Test heraus. Im Vergleich zu den ermittelten KiHAI-Werten monomerer α-2,6-SL (KiHAI = 100 mM) oder dem publizierten Wert für α-Methylsialosid (KiHAI = 2 mM) konnte bezüglich der SA-Konzentration der untersuchten PGSA LPG₁₀SA_{0.70} **1c** als Binder mit dem höchsten Verstärkungsfaktor (17.000 bezüglich α-2,6-SL bzw. 300 bezüglich α-Methylsialosid) identifiziert werden.

Tabelle 19: Inhibitionskonstanten aus HAI- und Zellbindungsinhibitionstests mit den effektivsten PGSA-Varianten und monovalenten Sialosiden. KiHAI-Werte sind respektive der SA- oder NP-Konzentration gemeinsam mit dem SEM ($N \geq 3$) dargestellt. IC₅₀-Werte aus Bindungsinhibitionsexperimenten mit Erythrozyten sind mit dem SE logIC₅₀ dargestellt. Eine Übersicht über Inhibitionswerte aller untersuchten PGSA-Varianten ist in Tabelle S2 aufgezeigt. Für α -Methylsialosid wurden KiHAI- und K_D-Werte aus vorausgehenden Studien übernommen ([Sauter, Bednarski et al. 1989](#), [Mammen, Dahmann et al. 1995](#)).

Substanz (PG _{MW} SA _{GF})*	KiHAI _{SA} [μ M]	KiHAI _{NP} [nM]	Bindungs- inhibition IC _{50, NP} [μ M]	K _{D, app, NP} [μ M]
α -Methylsialosid	2000	-	-	2800 \pm 300
α -2,6-SL	100000	-	-	-
LPG ₁₀ SA _{0.40} 1b	19,5 \pm 5,9	328 \pm 98	3,74 \pm 0,50	10,10 \pm 2,90
LPG ₁₀ SA _{0.70} 1c	5,9 \pm 2,7	59 \pm 27	2,20 \pm 0,20	0,60 \pm 0,32
dPG ₁₀ SA _{0.15} 2b	9,3 \pm 1,7	358 \pm 66	59,1 \pm 3,1	1,46 \pm 0,65 und 82,5 \pm 24,0
dPG ₅₀₀ SA _{0.20} 3b	20,3 \pm 4,7	16 \pm 4	0,82 \pm 0,05	0,013 \pm 0,006 und 1,35 \pm 0,43

Strukturuntersuchungen der Polymere mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) und Kryo-TEM zeigten, dass alle Polymere eine regelmäßige sphärische Struktur aufweisen (Tabelle S1) ([Bhatia, Lauster et al. 2017](#)). Anhand der sphärischen Geometrien konnte über die Ermittlung der Partikelgrößen die Kugeloberflächen berechnet werden. Zusammen mit NMR-Messungen zur Bestimmung der Anzahl an SA-Rezeptoren pro Polymer konnte dann die Rezeptordichte berechnet werden (Tabelle S1). Während LPG₁₀ und dPG₁₀ basierte Binder ein Optimum in der Sialinsäuredichte zwischen 0,25 und 1 SA/nm² zeigten (Abbildung 20 B), wiesen PGSA-Varianten mit dem größeren dPG₅₀₀ Polymerkern ein Optimum bei ca. 2 SA/nm² auf (Abbildung 20 C). Die ermittelten Optima liegen damit im Bereich von den Sialinsäuredichten, die für Säuerzellen bestimmt wurden (0,5 -2 SA/nm²) ([Mammen, Choi et al. 1998](#)).

Zur weiteren Charakterisierung der Inhibition der Polysialoside wurde ein ergänzender Zellbindungsinhibitionstest durchgeführt (Abschnitt 3.2.12). Bei diesem Verfahren wird die Bindung von R18-markierten Viren an Erythrozyten in Gegenwart unterschiedlicher Inhibitorkonzentrationen mit einem Durchflusszytometer fluoreszenzspektroskopisch detektiert (Abbildung 21 A-D). Für die Bestimmung der Bindungsinhibition wurden inhibitorbehandelte Proben zu unbehandelten Proben ins Verhältnis gesetzt.

Hierbei stellte sich heraus, dass Polyglycerole mit Sialinsäuredichten außerhalb des optimalen FG, analog zu den Ergebnissen aus HAI-Experimenten, schwächere bis keine nachweisbare

Inhibition (z.B. LPG 1 **d** und **e**) bis zu einer gemessenen Konzentration von 4 mM SA verursachten. Optimale Binder hingegen erreichten nano- bis mikromolare IC_{50} -Werte bezüglich der NP-Konzentration (Abbildung 21 D, Tabelle 19 und Tabelle S2). Wie im HAI-Test demonstrierte das $dPG_{500}SA_{0,20}$ **3b** mit einem IC_{50} -Wert von 0,82 μM die höchste antivirale Effizienz.

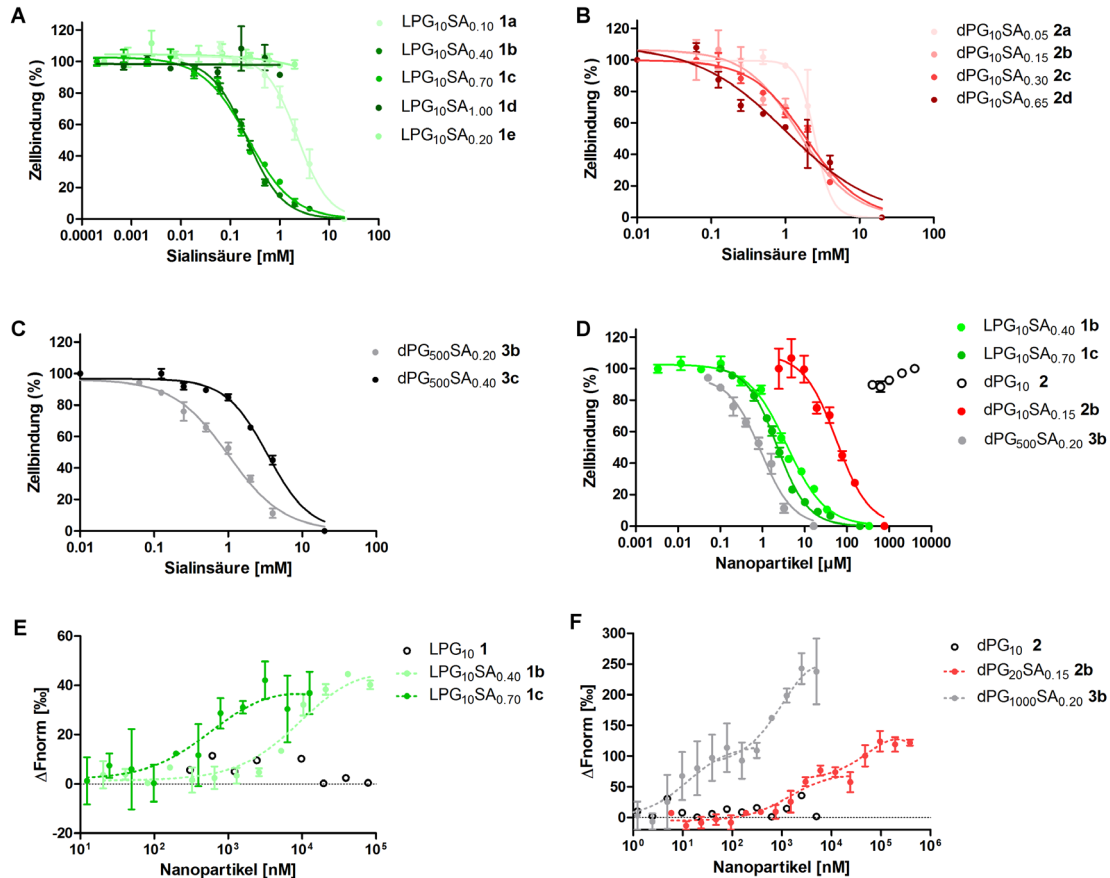


Abbildung 21: Hemmung der Bindung von R18-markierten A/X31 (H3N2) Viren an humane Erythrozyten und Affinitätsmessungen mit Polyglycerolsialosiden. Durchflusszytometrische Bestimmung der Bindung von R18-markierten Viren an humane Erythrozyten in Gegenwart von A) 10 kDa lineare Polyglycerolsialoside (LPG₁₀ Serie) B) 10 kDa dendritische Sialoside (dPG₁₀ Serie) C) und 500 kDa dendritische Sialoside (dPG₅₀₀ Serie) gegenüber 16 HAU/ μl A/X31 (H3N2). A-C zeigen Konzentrationswerte respektive der SA-Konzentration. D) Darstellung der effektivsten Bindungshemmer bezugnehmend auf die NP-Konzentration. Fehlerbalken zeigen den SEM ($N \geq 3$). Ermittelte IC_{50} -Werte sind in Tabelle 19 und Tabelle S2 aufgelistet. E, F) MST gestützte Affinitätsbestimmung linearer (E) und dendritischer Polysialoside (F) an R18 markierten A/X31 (H3N2) Viren (4 HAU). Dargestellt ist die Änderung der Fluoreszenz (ΔF_{norm}) markierter Viren nach Bindung an multivalente Nanopartikel. dPG₁₀ **2** und LPG₁₀ **1** dienten als Kontrolle. Über das Massenwirkungsgesetz wurden aus den Titrationsexperimenten apparente Dissoziationskonstanten ($K_{D,app,NP}$) berechnet (siehe Tabelle 19). Die Fehlerbalken zeigen den SEM ($N \geq 3$).

Als nächstes wurden mit der mikroskaligen Thermophorese (MST) Affinitätswerte derjenigen PGSA-Varianten bestimmt, die sich in Bindungsinhibitionstests als effizienteste Virusinhibitoren herausstellten. Bei dieser Methode (Abschnitt 3.2.19) wurden 4 HAU A/X31 (H3N2) Viren

mit R18 fluoreszenzmarkiert und gegenüber einer Verdünnungsreihe von Vertretern einer jeden Polysialosidserie vermessen. Dabei konnten für $\text{LPG}_{10}\text{SA}_{0.40}$ **1b** und $\text{LPG}_{10}\text{SA}_{0.70}$ **1c** apparente Dissoziationskonstanten ($K_{D,\text{app},\text{NP}}$) von 10 μM bzw. 0,6 μM respektive der NP-Konzentration bestimmt werden. Die dendritischen Polyglycerole $\text{dPG}_{500}\text{SA}_{0.20}$ **3b** und $\text{dPG}_{10}\text{SA}_{0.15}$ **2b** demonstrierten ein biphasisches Bindungsverhalten gegenüber A/X31 (H3N2) (Abbildung 21 F), aus dem je zwei $K_{D,\text{app},\text{NP}}$ -Werte bestimmt wurden (Tabelle 20). Während $\text{dPG}_{10}\text{SA}_{0.15}$ **2b** mikromolare $K_{D,\text{app},\text{NP}}$ -Werte aufwies, erreichte eine der beiden Bindungskurven für $\text{dPG}_{500}\text{SA}_{0.20}$ **3b** sogar einen $K_{D,\text{app},\text{NP}}$ -Wert von 13 nM.

Da ähnliche Polyglycerolsialoside in einer früheren Studie ([Papp, Sieben et al. 2011](#)) in der Lage waren, durch Bindung an die HA1-Domäne die virale Fusionseffizienz von A/X31 (H3N2) herabzusetzen, wurden die in der vorliegenden Arbeit effektivsten dPGSA- und LPGSA-Vertreter auch auf ihr Fusionsinhibitionspotential hin untersucht (Abbildung 22).

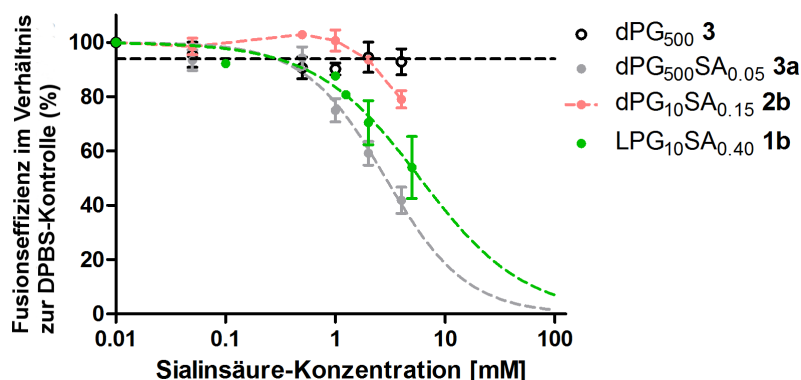


Abbildung 22: Hemmung der viralen Fusionseffizienz durch dendritische Polyglycerolsialoside. Darstellung der ermittelten Fusionseffizienz von R18-markierten A/X31 (H3N2) Viren mit Ghosts aus Fusionsexperimenten. Die Viren wurden mit Inhibitoren oder DPBS vorbehandelt, mit Ghosts gemischt und durch pH-Absenkung (pH 5,5) zur Fusion gebracht. Fehlerbalken zeigen den SEM ($N \geq 3$). An die gezeigten Datenpunkte wurden Kurven (gestrichelte Linien) mittels einer 4-parametrischen, logarithmischen Funktion angepasst. Die ermittelten IC_{50} -Werte sind in Tabelle 20 dargestellt.

Dafür wurde der bereits beschriebene Fusionstest (Abschnitt 4.1.3) mit R18-markierten A/X31 (H3N2) Viren durchgeführt. Während das nichtfunktionalisierte dPG_{500} **3** keinen Einfluss auf die virale Fusionseffizienz zeigte, konnten mit $\text{dPG}_{500}\text{SA}_{0.20}$ **3b** und $\text{LPG}_{10}\text{SA}_{0.40}$ **1b** $\text{IC}_{50,\text{NP}}$ -Werte von 0,37 μM bzw. 98,33 μM ermittelt werden. Das kleinere dendritische $\text{dPG}_{10}\text{SA}_{0.15}$ **2b** konnte bei einer maximal eingesetzten Konzentration von 4 mM SA die virale Fusionseffizienz lediglich um 20 % herabsetzen. Ein Einfluss auf die Fusionskinetik konnte mit diesen Inhibitoren nicht beobachtet werden. Konsistent mit den Fusionsexperimenten mit den monovalenten Bindern (Abschnitt 4.1.3) führte eine Interaktion der Inhibitoren mit der HA1-Domäne von HA zu einer verminderten Bindung der Viren an Ghosts, was sich anhand einer reduzierten Fusions-

effizienz widerspiegelt. Von einer Wechselwirkung mit der fusionsvermittelnden HA2-Domäne kann im Falle der untersuchten PGSA daher abgesehen werden.

Tabelle 20: Mittelwerte der halb maximalen Fusionseffizienz aus Fusionsinhibitionsexperimenten mit A/X31 (H3N2) Viren in Gegenwart von LPGSA und dPGSA. Dargestellt sind IC_{50} -Werte bezüglich der SA- und NP-Konzentration, die aus einer 4-parametrischen, logarithmischen Kurvenanpassung der Datenpunkte aus Fusionsinhibitionsexperimenten (Abbildung 22) resultierten. IC_{50} -Werte sind mit dem SE $\log IC_{50}$ dargestellt. Inhibitoren, die zu keiner Inhibition führten oder für die kein IC_{50} -Wert bestimmt werden konnte (dPG₁₀SA_{0.15} **2b**), sind mit einem Minus (-) gekennzeichnet.

Substanz	Fusionsinhibition	Fusionsinhibition
	$IC_{50,SA}$ [mM]	$IC_{50,NP}$ [μ M]
dPG ₅₀₀ 3	-	-
dPG ₁₀ SA _{0.15} 2b	-	-
dPG ₅₀₀ SA _{0.20} 3b	0,46 \pm 0,04	0,37 \pm 0,03
LPG ₁₀ SA _{0.40} 1b	5,90 \pm 0,10	98,33 \pm 1,67

Da die hier studierten LPGSA- und dPGSA-Varianten im bisherigen Verlauf der vorliegenden Arbeit eine virale Bindung und die Fusionseffizienz von A/X31 (H3N2) reduzieren konnten, wurden die Substanzen weiter auf ihr Infektionsinhibitionspotential hin untersucht. Zu diesem Zweck wurde ein Zellviabilitätstest nach Infektion von MDCK-II Zellen mit Inhibitor behandelten A/X31 (H3N2) Viren durchgeführt (Abbildung 23). Zuvor wurden die antiviralen Substanzen jedoch auf Toxizität untersucht. Dafür wurden MDCK-II Zellen mit den bisher effizientesten Vertreter der drei PGSA-Serien in einer Verdünnungsreihe für 24 h inkubiert und anschließend auf Zellviabilität untersucht. Dabei konnte bis zu einer getesteten Konzentration von 500 μ M SA für keine der untersuchten PGSA ein Einfluss auf die Zellviabilität festgestellt werden (Abbildung 23 A).

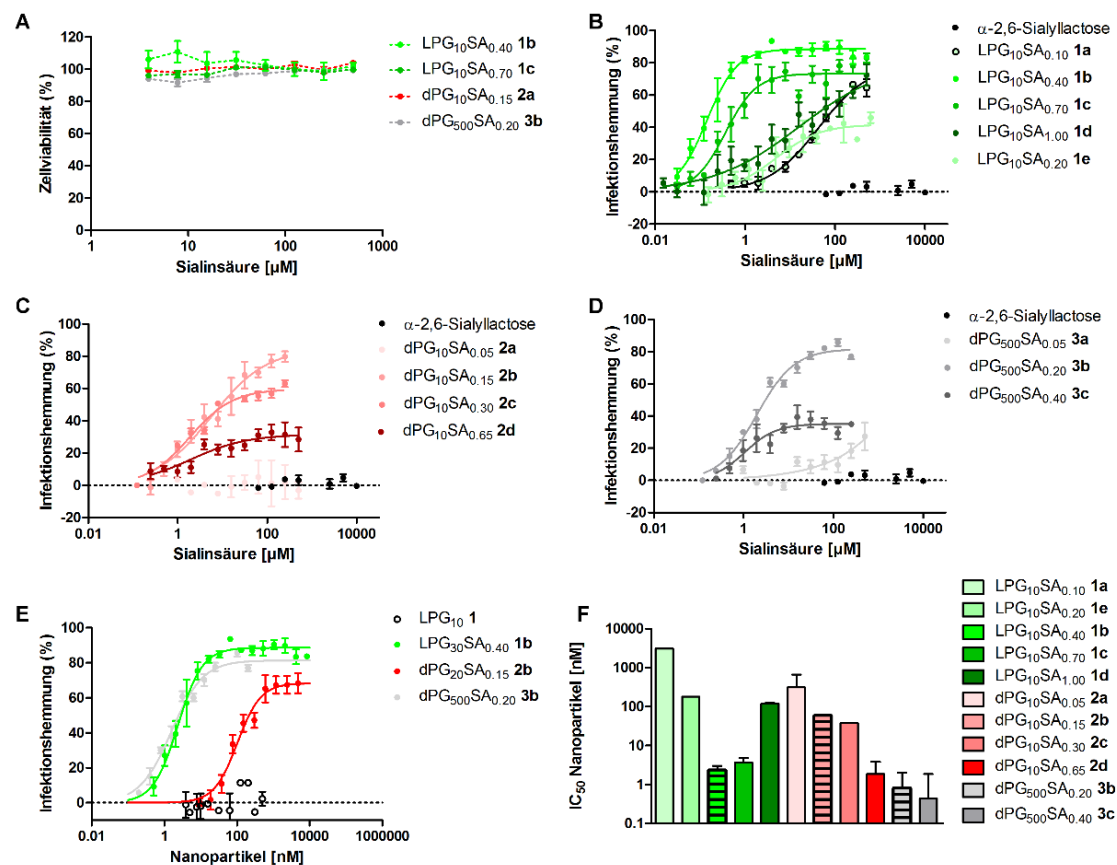


Abbildung 23: Dosisabhängige Wirkung von PGSA mit unterschiedlichem Funktionalisierungsgrad auf die Zytotoxizität und Hemmung von IAV. Dargestellt sind Ergebnisse aus Zellviabilitätsmessungen zur Bestimmung einer A) durch PGSA verursachten Reduktion der Zellviabilität 24 h nach Exposition von MDCK-II Zellen und B-F) der Hemmung virusinduzierter Zytotoxizität in MDCK-II Zellen 24 h nach Exposition mit Viren (MOI 0,05), die mit B) LPGSA-Varianten C) 10 kDa dPGSA-Varianten und D) 500 kDa dPGSA-Varianten 30 min bei RT vorinkubiert wurden. Monomere α -2,6-SL und nicht sialinisierte PG dienten als Kontrollen. E) Darstellung der besten Inhibitoren jeder Gerüststrukturserie respektive ihrer NP-Konzentration. Das nicht modifizierte LPG_{10} 1 wurde als Kontrolle herangezogen. Datenpunkte wurden unter Zuhilfenahme einer 4-parametrischen, logarithmischen Funktion angepasst. Die daraus ermittelten IC_{50} -Werte können in Tabelle S3 eingesehen werden. F) Darstellung aller $\text{IC}_{50,\text{NP}}$ -Werte respektive ihrer NP-Konzentrationswerte in einem Balkendiagramm. Inhibitoren, die bei der geringsten Rezeptordichte den niedrigsten IC_{50} -Wert aufwiesen, sind mit Querstreifen hervorgehoben. In allen Abbildungen zeigen die Fehlerbalken den SEM ($N \geq 3$).

Diese untersuchten Polymere eignen sich demzufolge auch für zellbasierte Studien. Sie wurden folglich für Infektionsinhibitionsstudien eingesetzt, indem Viren mit den Inhibitoren vorinkubiert wurden, bevor MDCK-II Zellen mit der Virus-Inhibitorsuspension (MOI 0,05) für 24 h behandelt wurden. Während das monovalente Trisaccharid α -2,6-SL (Abbildung 23 B-F), sowie der unfunktionalisierte Kontrollinhibitor LPG_{10} 1 (Abbildung 23 E) keine antivirale Wirkung aufwiesen, zeigten die sialinisierten Inhibitoren eine dosisabhängige Infektionshemmung (Abbildung 23 B-F). Für die effektivsten Binder (Abbildung 23 E und Tabelle 21) konnten dabei nanomolare $\text{IC}_{50,\text{NP}}$ -Werte (1,6 - 215 nM) bestimmt werden (Tabellen 21 und Tabelle S3). Wie bei den HAI-Experimenten zeigten die dendritischen Inhibitoren mit einem FG von 15-20 %, die

sowie die linearen PGSA mit einem FG von 40-70 % das höchste antivirale Potential (Abbildungen 23 B-F). Inhibitoren, die einen geringeren FG aufwiesen, reduzierten die Infektion nur schwach, PGSA-Varianten mit einem FG oberhalb des optimalen Bereichs, führten zu einem verminderten Inhibitionspotential (Abbildung 23 B-D). Durch einen Vergleich aller $IC_{50,NP}$ -Werte aus den Infektionsinhibitionsexperimenten (Abbildung 23 F) konnte festgestellt werden, dass lediglich die besten Inhibitoren aus Bindungsinhibitionsexperimenten (**1b**, **1c**, **2b** und **3c**) die maximale Zellviabilität in Gegenwart von Influenzaviren aufrecht erhalten konnten.

Tabelle 21: Ergebnisse aus Infektionsinhibitionsexperimenten mit den effizientesten IAV-Bindern. Dargestellt sind IC_{50} -Mittelwerte (MOI 0,05) respektive der SA- oder NP-Konzentration aus 24 h Infektionsinhibitionsexperimenten mit A/X31 (H3N2) (MOI 0,05). Die IC_{50} -Werte sind zusammen mit dem SE $\log IC_{50}$ dargestellt. Eine komplette Übersicht der IC_{50} -Werte aller getesteten Inhibitoren ist in Tabelle S3 aufgeführt.

Substanz (PG _{MW} SA _{FG})	Infektions- inhibition $IC_{50,SA}$ [μ M]	Infektion- inhibition $IC_{50,NP}$ [nM]
LPG ₁₀ 1	-	500000
LPG ₁₀ SA _{0.40} 1b	$0,14 \pm 0,05$	$2,35 \pm 0,83$
LPG ₁₀ SA _{0.70} 1c	$0,37 \pm 0,09$	$3,69 \pm 0,91$
dPG ₁₀ SA _{0.15} 2b	$5,59 \pm 0,18$	$215,15 \pm 6,92$
dPG ₅₀₀ SA _{0.20} 3b	$1,98 \pm 0,08$	$1,60 \pm 0,06$

In einem weiteren Testverfahren wurde das Infektionsinhibitionspotential der effektivsten PGSA-Varianten (LPG₁₀SA_{0.40} **1b**, dPG₁₀SA_{0.15} **2b** und dPG₅₀₀SA_{0.20} **3b**) anhand des Expressionsniveaus des viralen Nukleoprotein (NP^{IAV}) untersucht (Abbildungen 24 A und S1). Das NP^{IAV} wurde 24 h nach Infektion von MDCK-II Zellen (MOI 0,1) mit Inhibitor vorbehandelten Viren über eine Immunfärbung detektiert und quantifiziert. Gemessen an einer reduzierten Anzahl NP^{IAV}-exprimierender Zellen zeigte LPG₁₀SA_{0.40} **1b** im Unterschied zu dPG₁₀SA_{0.15} **2b** ab einer Konzentration von 30 μ M SA eine signifikant stärkere Infektionsinhibition (Abbildung 24 A). Außerdem konnte die Infektion mit LPG₁₀SA_{0.40} **1b** bei jeder getesteten Konzentration stärker gehemmt werden als mit dPG₅₀₀SA_{0.20} **3b**.

Als nächstes wurden Infektionsinhibitionsexperimente durchgeführt, bei denen die Inhibitoren nach der Zellinfektion zugegeben wurden. Bei diesen Experimenten sollte geklärt werden, ob dadurch eine multizyklische Influenzavirusvermehrung herabgesetzt werden kann und ob neben A/X31 (H3N2) auch andere Influenzastämme (A/mallard/439/2004 (H3N2) und A/turkey/Italy/472/1999 (H7N1)) inhibiert werden können (Abbildung 24 B). Hierfür wurden MDCK-II Zellen zunächst mit Influenzaviren (MOI 0,1) für 1 h infiziert und dann mit 10 μ M

SA LPG₁₀SA_{0.04} **1b** oder dPG₁₀SA_{0.15} **2b** für 24 h inkubiert. Daraufhin wurde der Virustiter im Überstand ermittelt. Für Kontrollmessungen wurde die nichtfunktionalisierten Polyglycerole LPG₁₀ **1** und dPG₁₀ **2** oder die Zugabe von Medium ohne Substanz herangezogen. Die beiden Inhibitoren **1b** und **2b** konnten hierbei eine Reduktion des Virustiters von A/X31 (H3N2) um vier bzw. drei Größenordnungen reduzieren. Dabei war das lineare Polyglycerolsialosid signifikant besser als das dendritische Polymer. Auch die Virustiter der beiden aviären Influenzastämme (A/mallard (H3N2) und A/turkey/Italy (H3N2)) konnten um vier oder um eine logarithmische Stufe signifikant herabgesetzt werden. Im Vergleich zu dem IAV-Binder **2b** konnte für den Inhibitor **1b** nur gegenüber A/mallard (H3N2) eine signifikant stärkere Inhibition bestimmt werden, während gegenüber den anderen getesteten Virusstämmen ähnliche antivirale Effekte für diese beiden multivalenten Inhibitoren festgestellt werden konnte. Bei A/turkey/Italy (H7N1) zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Behandlung mit den Bindern **1b** oder **2b**. Die Kontrollbehandlungen führten erwartungsgemäß zu keiner relevanten Inhibition der Virusvermehrung.

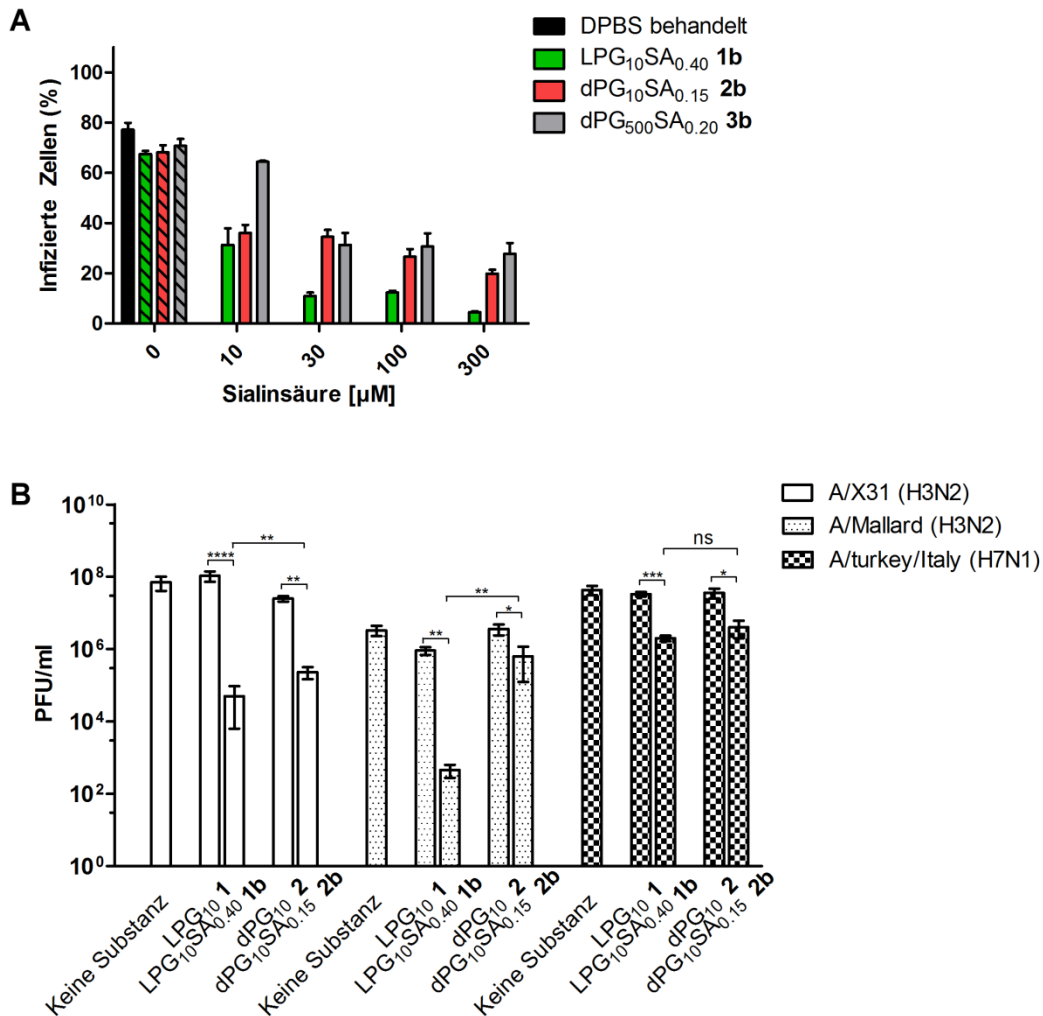


Abbildung 24: Mittelwerte aus Infektionsinhibitionsexperimenten zur Ermittlung der NP^{IAV} -Expression und des IAV-Titers in Gegenwart verschiedener PGSA. A) A/X31 (H3N2) bedingte Expression von NP^{IAV} 24 h nach Infektion (MOI 0,05) von MDCK-II Zellen. Vor der Infektion wurden die Viren 30 min mit 10-300 μM SA-Äquivalenten der effektivsten PGSA-Varianten bei RT inkubiert. Die NP^{IAV} -Expression wurde durch eine Immunfärbung detektiert und mittels einer softwarebasierten Bildanalyse wurde der Anteil an infizierten Zellen quantifiziert. DPBS behandelte Viren oder solche, die mit 300 μM Nanopartikel jeder unmodifizierten Gerüststruktur (mit Streifenmuster hervorgehoben) behandelt wurden, dienten als Negativkontrolle. Die Fehlerbalken verweisen auf den SEM ($N \geq 3$). B) Virustiter 24 h nach Infektion von MDCK-II Zellen. Die Zellen wurden mit A/X31 (H3N2), A/mallard (H3N2) oder A/turkey/Italy/ (H7N1) (MOI 0,1) für 1 h infiziert. Danach wurde der Überstand mit neuem Medium, das entweder die verschiedenen Polysialoside (10 μM SA), die entsprechende Kontrollsubstanzen (äquimolar zur NP-Konzentration der entsprechenden PGSA-Binder) oder keine Substanzen enthielt. Im Anschluss wurden die Zellen für 24 h bei 37°C inkubiert. Fehlerbalken zeigen den SEM ($N=3$). Die Daten wurden mittels eines Mann-Whitney t-Tests statistisch analysiert (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$). Die Daten aus Abbildung B wurden von Marlena Stadtmüller (RKI, Berlin) erhoben.

Als nächstes wurden die effizientesten PGSA-Varianten anhand von Infektionsexperimenten mit Mäusen weiter auf eine Wirksamkeit *in vivo* untersucht. Dabei wurde ein experimentelles Vorgehen gewählt, bei dem sedierte BALB/c Mäuse über eine intranasale Gabe einer

sublethalen Dosis (100 pfu) an A/X31 (H3N2) Viren infiziert wurden. Vor der Infektion wurden die Viren mit Inhibitor oder einer Kontrolle für 30 min bei RT inkubiert (Abbildung 25). Nach der Infektion wurde bei den Mäusen der infektionsbedingte Gewichtsverlust über einen Zeitraum von 11 Tagen beobachtet. Infizierte und nicht inhibitorbehandelte Mauskoorten verloren vier Tage nach Infektion ca. 10 % Körpergewicht (Abbildung 25 B-F). Nicht infizierte Mäuse hingegen behielten ihr Körpergewicht über einen Zeitraum von 11 Tagen (Abbildung 25 F). Wurden die Viren mit den effektivsten Inhibitoren einer jeden PG-Serie vorbehandelt, führte dies nach der Infektion zu einem signifikant geringeren Gewichtsverlust. Durch einen Vergleich der Inhibitoren mit Kontrollgruppen am Tag 4 nach Infektion zeigte sich die antivirale Wirkung der PGSA-Varianten am deutlichsten (Abbildung 25 A). Unter den getesteten PGSA-Varianten war besonders der protektive Effekt von 6,25 $\mu\text{mol SA/kg}$ an $\text{LPG}_{10}\text{SA}_{0,40}$ **1b** herausstechend. **1b** war sogar in der Lage, einen infektionsbedingten Gewichtsverlust fast vollständig zu unterbinden (Abbildung 25 B). Bei geringerer Inhibitormenge (1,25 $\mu\text{mol SA/kg}$) war zwar der antivirale Effekt schwächer, jedoch immer noch höher als bei Mäusen, die mit LPG_{10} **1** oder DPBS behandelt wurden.

Zur weiteren Bewertung des antiviralen Potentials von $\text{LPG}_{10}\text{SA}_{0,40}$ **1b** wurde der Inhibitor als nächstes mit dem klinisch zugelassenen Neuraminidaseinhibitor Oseltamivir verglichen. Für eine nasale Verabreichung von Oseltamivir wurde die hydrolysierte und biologisch aktive Form Oseltamivircarboxylat (OC) gewählt. Dabei wiesen Mauskoorten, die mit 104 nmol/kg OC behandelt wurden einen signifikant höheren Gewichtsverlust auf als solche, die mit einer äquimolaren Menge an $\text{LPG}_{10}\text{SA}_{0,40}$ **1b** behandelt wurden (Abbildung 25 C). Selbst bei der Gabe einer 10-fach höheren Dosis an OC konnte lediglich an Tag 3 und 4 ein signifikanter antiviraler Effekt festgestellt werden. Bei einer kombinierten Gabe beider Inhibitoren (je 104 nmol/kg) konnte sogar ein synergistischer Effekt beobachtet werden, durch den die Mäuse ihr Körpergewicht genauso, wie nichtinfizierte Mäuse halten konnten. Die beiden Vertreter der beiden dPGSA-Serien ($\text{dPG}_{10}\text{SA}_{0,15}$ **2b** und $\text{dPG}_{500}\text{SA}_{0,20}$ **3b**) waren im Vergleich zu $\text{LPG}_{10}\text{SA}_{0,40}$ **1b** weniger effektiv, jedoch konnte an Tag 3 und 4 für $\text{dPG}_{10}\text{SA}_{0,15}$ **2b** und an Tag 4 für $\text{dPG}_{500}\text{SA}_{0,20}$ **3b** immer noch ein signifikant geringerer Körpergewichtsverlust erzielt werden.

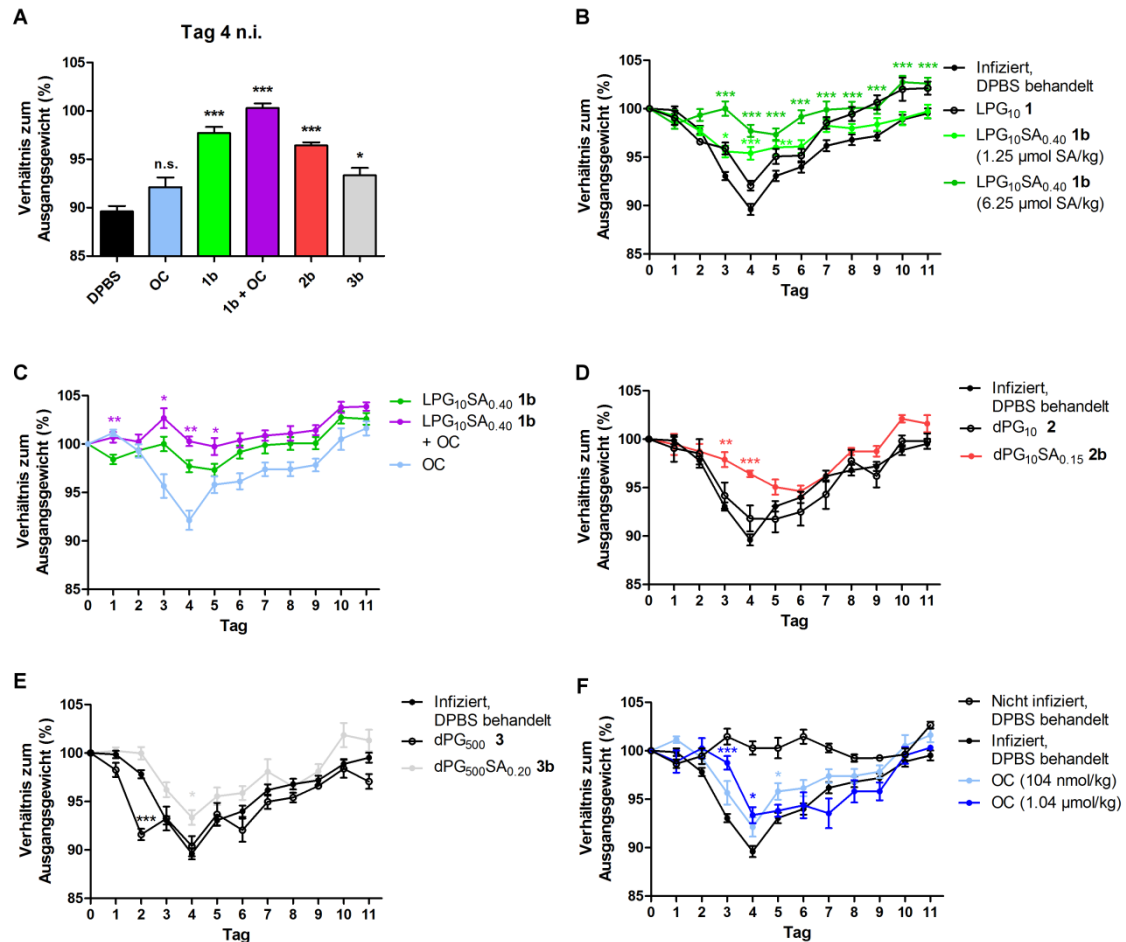


Abbildung 25: Gewichtsverlauf von BALB/c Mäusen nach Infektion mit Inhibitor vorbehandelten A/X31 (H3N2) Viren. Die Viren wurden 30 min bei RT mit oder ohne Inhibitor vorbehandelt und dann sedierten Mäusen intranasal verabreicht. A) Gewichtsverlust von Mäusen, 4 Tage nach (n.i.) Infektion. Tag 4 repräsentiert das Minimum des Gewichtsverlustverlaufs nach Infektion mit einer sublethalen Influenza-Dosis (siehe infizierte, DPBS behandelte Kontrolle in Abbildung B, D-F). Dargestellt ist der Vergleich von DPBS oder Inhibitor vorbehandelten Viren (30 min bei RT). Dabei wurden entweder 104 nmol Oseltamivircarboxylat (OC)/kg, 6,25 µmol SA/kg LPG₁₀SA_{0,40} **1b** oder die Kombination aus beiden Substanzen eingesetzt. Darüber hinaus wurden 6,25 µmol SA/kg an dPG₁₀SA_{0,15} **2b** oder dPG₅₀₀SA_{0,20} **3b** eingesetzt. Die Fehlerbalken zeigen den SEM (n≥10). B-F) Darstellung der täglichen Änderung der Mausgewichte relativ zum Ausgangsgewicht nach Infektion mit vorbehandelten A/X31 (H3N2) Viren über einen Zeitraum von 11 Tagen. B) Vergleich des infektionsbedingten Gewichtsverlaufs von Mauskohorten, die entweder mit 6,25 µmol SA/kg (= 104 nmol NP/kg), 1,25 µmol SA/kg LPG₁₀SA_{0,40} **1b**, einer äquimolare NP-Menge (104 nmol/kg) an Kontrollinhibitor LPG₁₀ **1** oder mit DPBS behandelt wurden. Fehlerbalken zeigen den SEM (N≥10). C) Vergleich von Mauskohorten, die mit äquimolaren Mengen (104 nmol/kg) an LPG₁₀SA_{0,40} **1b**, OC oder der Kombination aus beiden Inhibitoren behandelt wurden. Fehlerbalken verweisen auf den SEM (N≥10). Die mit LPG₁₀SA_{0,40} **1b** oder LPG₁₀SA_{0,40} **1b** + OC behandelten und infizierten Kohorten wurden über einen t-Test statistisch ausgewertet. D) Vergleich von infizierten, DPBS behandelten Mauskohorten mit dPG₁₀SA_{0,40} **1b** (6,25 µmol SA/kg) oder Kontrollinhibitor dPG₁₀ **2** behandelten Gruppen. Fehlerbalken zeigen den SEM (N≥5). E) Vergleich von infizierten, DPBS behandelten Mauskohorten mit dPG₅₀₀SA_{0,20} **3b** (6,25 µM SA/kg) oder Kontrollinhibitor dPG₅₀₀ **3** behandelten Gruppen. Fehlerbalken zeigen den SEM (N≥5). F) Infizierte, DPBS behandelte Mauskohorten im Vergleich zu Gruppen, die mit OC (104 oder 1,04 nmol/kg) behandelt wurden. Die Fehlerbalken zeigen den SEM (N≥5) und die Daten aus den Abbildungen 25 A, B und

D-F wurden einer Ein-Weg-Varianzanalyse (ANOVA) unterzogen, gefolgt von einem Vergleichstest nach Dunnett mit DPBS behandelten Gruppen (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Zusammenfassend konnten in diesem Abschnitt optimale Rezeptordichten für LPGSA (45-70 % SA) und den unterschiedlich großen dPGSA-Varianten (15-20 % SA) bezüglich der Inhibition von IAV identifiziert werden. In Bindungsinhibitions- und Zellviabilitätsexperimenten zeigte der Inhibitor dPG₅₀₀SA_{0,20} **3b** mit nanomolaren Inhibitionswerten das höchste antivirale Potential. In Infektionsversuchen zur Bestimmung der viralen Replikationseffizienz wies das lineare Polymer LPG₁₀SA_{0,40} **1b** die höchste antivirale Aktivität auf und in Experimenten mit Mäusen konnte das Ausmaß einer IAV-Infektion durch diesen Inhibitor fast vollständig verhindert werden. Durch die gleichzeitige Verabreichung von LPG₁₀SA_{0,40} **1b** mit dem Neuraminidaseinhibitor OC konnte dieser Effekt weiter verstärkt werden. Darüber hinaus konnte LPG₁₀SA_{0,40} **1b** auch die Replikation von zwei weiteren IAV-Stämmen (A/mallard (H3N2) oder A/turkey/Italy/ (H7N1)) signifikant herabsetzen.

4.3.2 Multivalente Präsentation von Peptiden auf dendritischen Polyglycerolen

Im vorherigen Abschnitt erwiesen sich multivalente PG-Sialoside mit einer justierten SA-Rezeptordichte als vielversprechende antivirale Biomimetika. Darüber hinaus wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch andere Rezeptoren für Influenza HA identifiziert (Abschnitt 4.1.1) und es wurde eine prinzipielle Eignung dieser alternativen Rezeptoren für das Verursachen eines multivalenten Verstärkungseffekts festgestellt (Abschnitt 4.2). Um diesen Aspekt weiterzuverfolgen, wurden die beiden Antikörperpeptide PeB und PeB^{GF} über eine kovalente Immobilisierung auf dPG-Gerüsten in löslicher Form dargestellt, um dann deren Anwendungspotential in antiviralen Testverfahren zu studieren (Abbildung 26). In diesem Zusammenhang wurden 15 Peptid-Konjugate auf Basis unterschiedlicher Polymerkerngrößen und Peptiddichten synthetisiert und für Bindungsinhibitions- und Infektionsstudien gegenüber A/X31 (H3N2) herangezogen. In diesem Zusammenhang wurde der Einfluss der Größe und dem FG der PG-Peptidkonjugate auf die antivirale Wirkung untersucht.

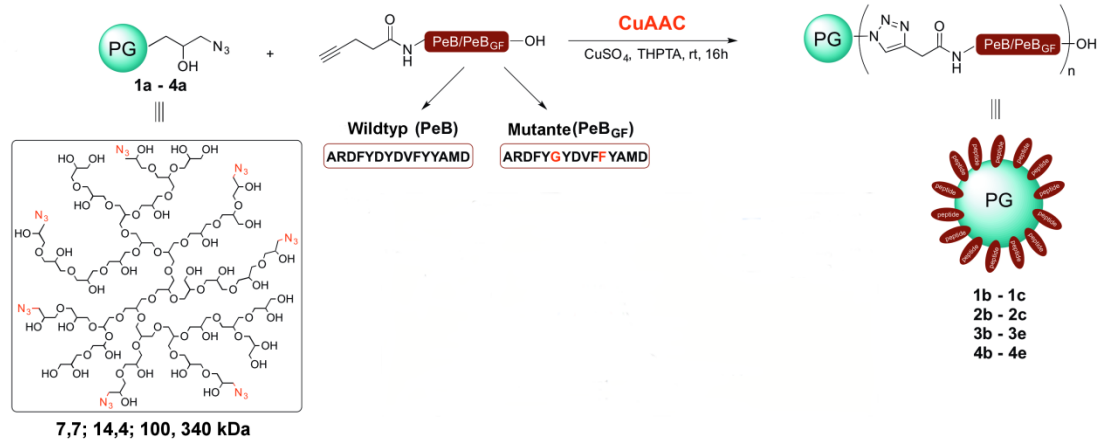


Abbildung 26: Darstellung der wesentlichen Syntheseschritte von PG-Peptidkonjugaten. dPG mit Molekulargewichten zwischen 7,7 bis 340 kDa wurden mittels einer kupferkatalysierten Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) mit den Peptiden PeB oder PeB^{GF} kovalent verknüpft. Alle Konjugate wurden von Maria Glanz (FMP Berlin) synthetisiert und sind in Tabelle S4 aufgeführt. Die Abbildung wurde von Maria Glanz erstellt.

Zunächst wurden die Inhibitoren in HAI-Experimenten gegenüber A/X31 (H3N2) getestet und miteinander verglichen (Abbildung 27 A und B). Dabei erwiesen sich für die Bindungsinhibition IAV-Binder mit 340 kDa Polymerkern im Vergleich zu Bindern mit kleinerem Polymerkern als effizienter. Aus HAI-Experimenten mit PeB oder PeB^{GF} präsentierenden 340 kDa PG-Gerüsten resultierten daraus nanomolare KiHAI_{NP}-Werte (Tabelle 23). Diese Werte waren signifikant geringer und damit stärker als Inhibitionswerte aus Experimenten mit dem monovalenten Peptid (Abbildungen 27 A, B und Tabelle 22). Des Weiteren stellte sich heraus, dass eine höhere Peptidbeladung im Vergleich zu einer geringen Beladung mit Peptiden in den meisten Fällen zu keiner Verbesserung des antiviralen Potentials führte. Der höherfunktionalisierte Inhibitor **4c** (15 % PeB) führte sogar zu einer stark verminderten Hämagglutinationsinhibition im Vergleich zu Inhibitor **4c**, welcher eine geringere Peptidbeschichtung (9 % PeB) besitzt. Interessanterweise führte im Gegensatz zur monovalenten Situation, bei der das Peptid PeB^{GF} effizienter als PeB war, eine multivalente Präsentation von PeB^{GF} im Vergleich zu einer multivalenten Darstellung von PeB nicht zu geringeren KiHAI-Werten.

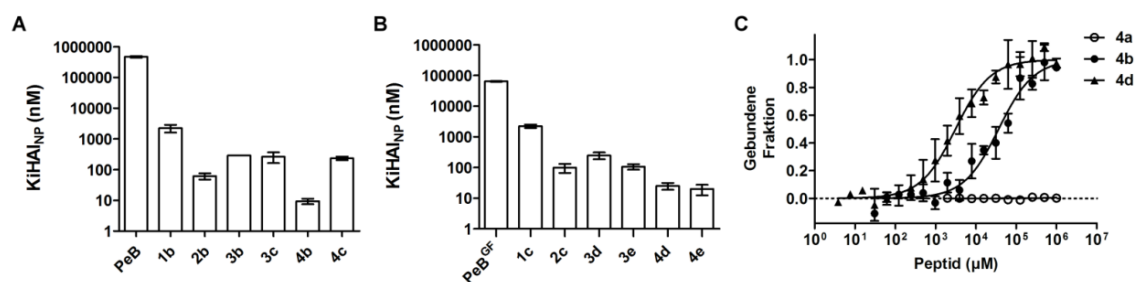


Abbildung 27: Affinität und Bindungsinhibition verschiedener PeB und PeB^{GF} funktionalisierte Polyglycerole gegenüber IAV. Dargestellt sind KiHAI-Werte respektive der NP-Konzentration aus HAI-Messungen mit A/X31 (H3N2) in Gegenwart von A) PeB und B) PeB^{GF}

funktionalisierten dendritischen Polyglycerolen (dPG). Als Vergleich sind die KiHAI-Werte aus Messungen mit den monovalenten Peptiden dargestellt. Die Nomenklatur zu den getesteten Inhibitoren ist in Tabelle 23 dargelegt. C) Bindungskurven aus MST-Messungen mit peptidkonjugierten und nichtkonjugierten 340 kDa dPG (4a= nichtkonjugiert dPG₃₄₀, 4b= PeB konjugiert, 4c= PeB^{GF} konjugiert) gegenüber R18-markierten A/X31 (H3N2) Viren. Die Fehlerbalken verweisen auf den SEM (N≥3). Die Datenpunkte wurden mittels der Funktion für das Massenwirkungsgesetz angepasst.

Aufgrund der Primärstruktur des Peptids PeB^{GF}, welches im Gegensatz zu PeB eine höhere Hydrophobizität aufweist, kann an dieser Stelle nicht ausgeschlossen werden, dass die PG-PeB^{GF}-Konjugate in HAI-Experimenten zu einem nicht vernachlässigbaren Anteil über unspezifische Wechselwirkungen mit Erythrozyten interagieren. Dadurch kann die für eine Interaktion mit Viren tatsächlich vorhandene Inhibitorkonzentration (effektive Konzentration) vermindert sein. Um dies aufklären zu können, wurden MST-Messungen mit den beiden besten IAV-Bindern aus HAI-Experimenten (**4b** und **4d**) durchgeführt, um eine direkte Interaktion mit A/X31 (H3N2) zu quantifizieren. Während für das nichtkonjugierte dPG₃₄₀-Azid (**4a**) keine Interaktion mit Viren festgestellt werden konnte, wurde für den Binder **4b** ein K_{D,app,Pep}-Wert von 36,6 µM PeB (entspricht einer NP-Konzentration von 88,3 ± 13 nM) bestimmt (Abbildung 27 c). Für den Binder **4d** wurde ein K_{D,app,Pep}-Wert von 3,1 µM PeB^{GF} (entspricht 6,8 ± 1,1 nM NP) gemessen. Damit bindet dPG₃₄₀PeB^{GF}₁₀ **4d** ca. 10-fach affiner an A/X31 (H3N2) als dPG₃₄₀PeB₉ **4b**, wodurch sich ein ähnlicher Trend, wie bei den Messungen mit den monovalenten Peptiden ergab (Tabelle 14).

Tabelle 22: Übersicht über KiHAI und IC₅₀-Werten aus HAI- und Infektionsinhibitions-experimenten. Dargestellt sind Mittelwerte mit dem SEM (N≥3). n.b. = nicht bestimmt. (-) = keine Inhibition viraler Bindung.

Substanz Abkürzung	KiHAI _{Pep} [µM]	KiHAI _{NP} [nM]	IC _{50,Pep} [µM]	IC _{50,NP} [nM]
1a	-	-	-	-
1b	54±15	2250±629	-	-
1c	69±9	2218±295	-	-
2a	-	-	-	-
2b	2±1	62±14	-	-
2c	4±1	99±32	34,6±0,1	960±2,7
3a	n.b.	n.b.	-	-
3b	31±0	289±0	0,8±0,1	7,5±1,0
3c	75±29	264±102	4,4±0,6	15,4±0,6
3d	33±8	247±62	2,5±0,1	18,5±0,5
3e	42±8	106±21	17,3±0,1	44,2±0,2
4a	-	-	-	-
4b	4±1	9±2	0,3±0,1	0,6±0,3
4c	163±22	236±31	69,5±0,0	100,7±0,1
4d	12±3	25±6	0,2±0,0	0,4±0,1
4e	15±6	20±7	0,9±0,0	1,2±0,1

Eine Bindungsinteraktion von PG-Peptidkonjugaten mit A/X31 (H3N2) konnte auch mittels Kryo-TEM-Aufnahmen nachgewiesen werden (Abbildung 28 B und C). Die Bindung von $\text{dPG}_{340}\text{PeB}^{\text{GF}}_{10}$ **4d** an die Virusoberfläche führte auch zu einem gehäuften Auftreten von Virusaggregation. Für den nichtfunktionalisierten Kontrollinhibitor $\text{dPG}_{340}\text{N}_3$ **4a** hingegen konnte weder eine vermittelte Aggregation von noch eine Bindung an A/X31 (H3N2) Viren beobachtet werden (Abbildung 28 A).

Im Folgeschritt wurde das Infektionsinhibitionspotential aller Binder mittels Zellviabilitätsexperimenten untersucht (Abbildung 29 B und C). Für die untersuchten PG-Peptidkonjugate konnten bis zu einer getesteten Peptidkonzentration von 200 μM keine zytotoxischen Effekte auf MDCK-II Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 29 A). In Infektionsstudien konnten mit den besten IAV-Bindern aus HAI-Experimenten (**4b** und **4d**) nano- bis pikomolare $\text{IC}_{50,\text{NP}}$ -Werte bei einer Vorbehandlung von A/X31 (H3N2) Viren bestimmt werden (Abbildung 29 B, C und Tabelle 22). Im Vergleich zu den IC_{50} -Werten aus Messungen mit den monovalenten Peptiden (Tabelle 14) konnten durch eine multivalente Präsentation von Peptiden bei geringem FG auf 340 kDa Gerüsten Verstärkungsfaktoren von 129 (PeB) und 136 (PeB^{GF}) berechnet werden.

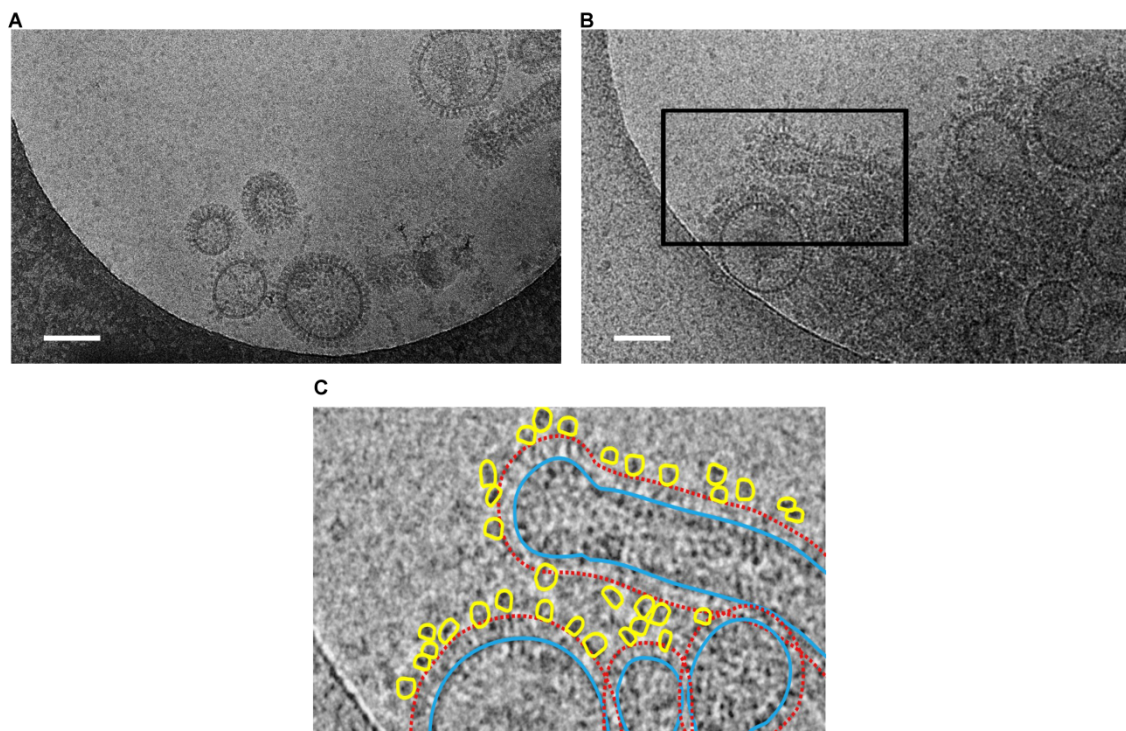


Abbildung 28: Kryo-TEM-Aufnahmen von A/X31 (H3N2) inkubiert mit peptidkonjugierten und nichtkonjugierten dPG_{340} -Polymeren. A) Kryo-TEM-Bild von A/X31 (H3N2), die mit dem Kontrollbinder $\text{dPG}_{340}\text{N}_3$ **4a** oder B) $\text{dPG}_{340}\text{PeB}^{\text{GF}}_{10}$ **4d** inkubiert wurden. Der weiße Balken repräsentiert einen Maßstab von 100 nm. C) Vergrößerung des gerahmten Bildausschnitts in Abbildung B mit Hervorhebung der PG-Peptidkonjugate (gelb) und Virionen (blau) mit Viruskorona (rot gestrichelt). Die Kryo-TEM-Bilder wurden von Dr. Kai Ludwig (FU Berlin) aufgenommen.

Die beiden Binder **4b** und **4d** erwiesen sich auch in einem weiteren Infektionsinhibitionstest, bei dem das virale NP^{IAV}-Niveau detektiert wurde, als effiziente antivirale Substanzen. 24 h nach Infektion von MDCK-II Zellen mit A/X31 (H3N2) Viren (MOI 0,1), die mit 33 µM Peptid an Inhibitor **4b** und **4d** vorbehandelt wurden, konnte eine signifikante Reduktion der NP^{IAV}-Expression im Vergleich zu DPBS behandelten Virenerzielt werden (Abbildungen 29 D und S2). Eine Behandlung mit dem Kontrollinhibitor **4a** oder DPBS hatte keine messbare Reduktion der NP^{IAV}-Expression zur Folge. Aufgrund der erfolgreichen Inhibitionswerte aus *in vitro* Versuchen wurde als nächstes ein Anwendungspotential der beiden besten Inhibitoren **4b** und **4d** in einem Mausmodell getestet. Dabei wurde wie im vorherigen Abschnitt mit den PGSA-Bindern den Mäusen eine Virus-Inhibitormischung intranasal verabreicht. Mausekohorten, die mit dem Kontrollinhibitor **4a** behandelt wurden, konnten nicht vor einem infektionsbedingten Gewichtsverlust geschützt werden (Abbildung 29 E). Hingegen konnten Mausekohorten, die mit 11,5 nmol NP/kg dPG₃₄₀PeB₉ **4b** behandelt wurden, bis Tag 4 ihr Körpergewicht halten. Eine geringere Inhibitorosis (2 nmol NP/kg) führte zu keinem signifikanten Infektionsschutz. Mäuse, die mit einer ähnlichen Dosis an Inhibitor dPG₃₄₀PeB^{GF}₁₀ **4d** behandelt wurden, waren zu keinem Zeitpunkt vor einer Infektion geschützt.

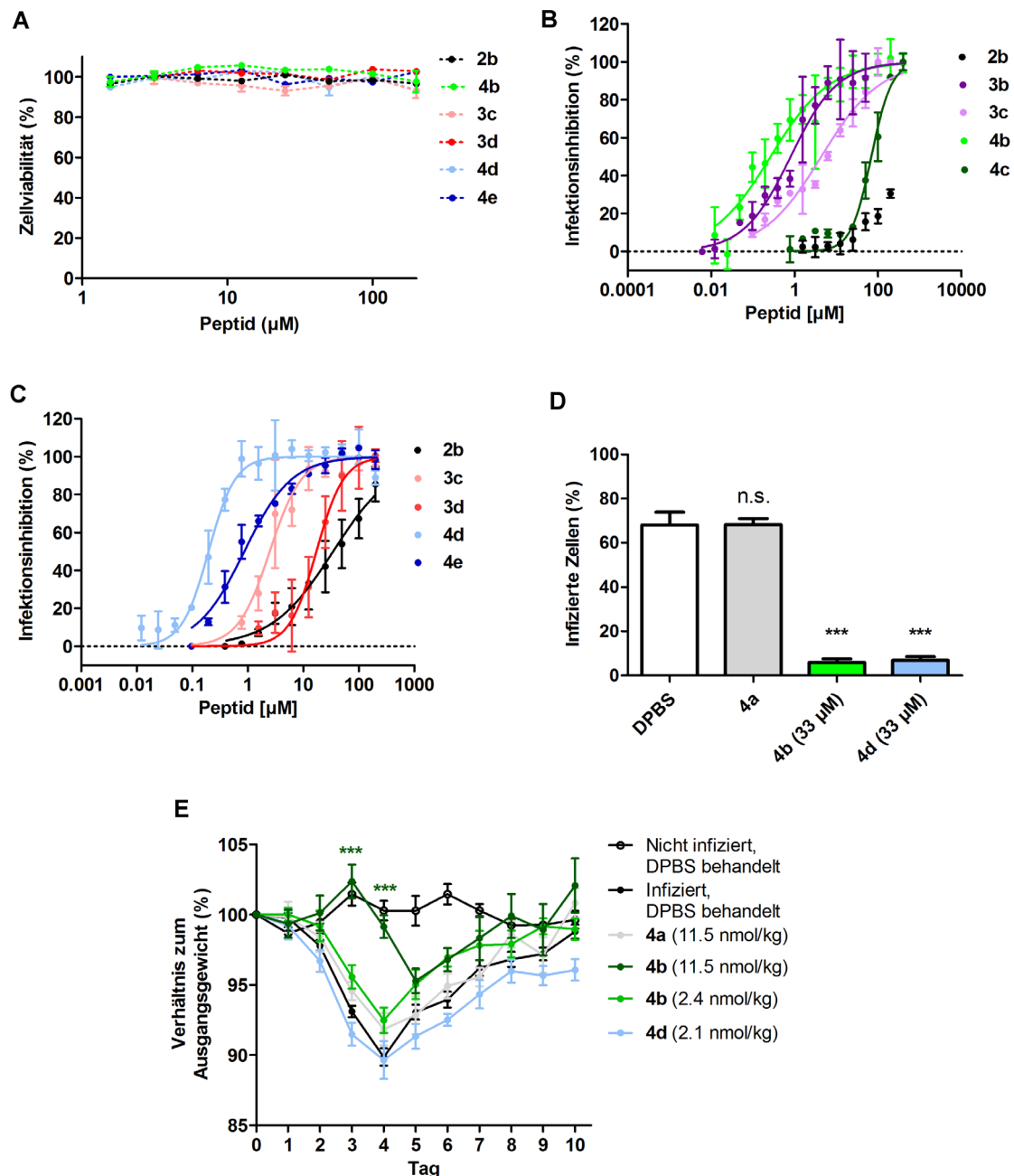


Abbildung 29: Antivirale und zytotoxische Wirkung verschiedener PG-Peptidkonjugate.

A) Bestimmung der Zellviabilität von MDCK-II 24 h nach Behandlung mit einigen selektierter IAV-Bindern. B,C) Infektionsinhibition von MDCK-II-Zellen (MOI 0,05) durch verschiedene B) PG-PeB- und C) PG-PeB^{GF}-Varianten. Die Mittelwerte aus Inhibitorverdünnungsreihen wurden über eine 4-parametrische, logarithmische Funktion angepasst, um IC₅₀-Werte zu ermitteln (Tabelle 23). D) Bestimmung des NP^{IAV}-Niveaus 24 h nach Infektion mit inhibitorbehandelten A/X31 (H3N2) Viren (MOI 0,1). Zur Kontrolle wurden Viren mit DPBS oder dem nichtfunktionalisierten PG **4a** behandelt. Die korrespondierenden Mikroskopiebilder sind in Abbildung S2 dargestellt. E) Tierstudien mit BALB/c-Mauskohorten, die mit vorbehandelten A/X31 (H3N2) Viren (100 pfu) bei angegebenen Bedingungen über eine intranasale Gabe infiziert wurden. Kontrollgruppen erhielten Viren, die mit DPBS oder dem unfunktionalisierten Binder **4a** behandelten wurden. Die Fehlerbalken in Abbildung 29 repräsentieren den SEM (N≥3). Die Mittelwerte aus D und E wurden über eine Ein-Weg-ANOVA und einem Mehrfachvergleich nach Dunnett mit DPBS behandelten Mausekohorten statistisch ausgewertet (***p<0,0001).

Zusammenfassend stellte sich heraus, dass große PG-Gerüste mit einer geringen Beschichtungsdichte der Antikörperpeptide PeB oder PeB^{GF} höhere antivirale Eigenschaften aufweisen als solche Konstrukte, die auf kleineren PG-Trägern oder einer höheren Peptidbeladungsdichte basieren. Mit den beiden Bindern dPG₃₄₀PeB^{GF}₁₀ **4d** und dPG₃₄₀PeB₉ **4b** konnten in HAI- und Infektionstests nanomolare Inhibitionswerte bestimmt werden. Darüber hinaus konnte mit dem Binder dPG₃₄₀PeB₉ **4b** ein temporärer Schutz vor einer Infektion mit IAV im Tiermodell gezeigt werden.

4.4 Definierte Rezeptor-Polymerkonjugate als IAV-Inhibitoren

In den folgenden zwei Abschnitten wurde eine Strategie gewählt, bei der HA bindende Rezeptoren in räumlich definierter Ausrichtung gegenüber HA von IAV auf Biomolekülgerüsten präsentiert werden. Als Gerüststrukturen wurden dafür starre PNA-DNA-Heteroduplexe oder Q β -Phagenkapside verwendet. Durch diese Herangehensweise konnten hoch affine Binder und im Vergleich zu statistischen Rezeptor-Polymerkonjugaten höhere Verstärkungsfaktoren für die Hemmung viraler Aktivität ermittelt werden.

4.4.1 Bestimmung des Rezeptorabstandes mit PNA-DNA basierten molekularen Linealen für eine optimale Bindung an HA

Um räumlich angepasste Binder gegen zwei benachbarten Rezeptorbindestellen eines HA-Trimers generieren zu können, ist es erforderlich den tatsächlichen Abstand der beiden kanonischen SA-Bindestellen von HA zu bestimmen (Abschnitt 1.1.4). Anhand der Kristallstruktur von HA (PDB:1HGG) aus A/X31 (H3N2) konnte unter zur Hilfenahme einer Strukturanalysesoftware ein direkter Abstand von ca. 42 Å^v zwischen den SA-Bindestellen ermittelt werden. Dieser Abstand entspricht der direkten Verbindung der C1-Atome von Glucosegruppen benachbarter SLN-Rezeptoren im Komplex mit HA. Topologische Unebenheiten wurden bei der Abstandsbestimmung jedoch nicht berücksichtigt. Außerdem ermöglicht eine Abstandsmessung anhand einer Kristallstruktur nur eine grobe Orientierung, da sich in wässriger Lösung der Abstand von SLN-Bindestellen innerhalb eines HA-Trimers verändern kann.

Für die Erfassung des tatsächlichen Abstands, der für eine Verbrückung von zwei SA-Bindestellen in wässriger Phase benötigt wird, wurden dafür PNA-DNA-Heteroduplexe herangezogen. PNA-DNA-Gerüste ermöglichen aufgrund ihrer starren Struktur eine abstandsabhängige Rezeptorpräsentation (Abbildung 30 A). Dieses Gerüst besteht aus einem 39 Nukleotid langem DNA-Templat, das mit zwei oder drei komplementären 13 Nukleotid langen PNA-Oligomeren hybridisiert wurde. Je zwei PNA-Oligomere präsentieren das monovalente Trisac-

^v Choi, S. K. berichtete von einem Abstand von 46 Å (Choi 2004)

charid α -2,6-SLN und das dritte Oligomer diene der Versteifung der PNA-DNA-Heteroduplex. Dadurch, dass zwischen den PNA-Segmenten keine kovalente Verknüpfung vorliegt (engl. *nick sites*), kann sich das Gerüst leicht krümmen, wodurch kleinere topologische Unebenheiten überbrückt werden können. Außerdem erhalten die Rezeptoren durch diese *nick sites* eine Rotationsbeweglichkeit, welche eine Spiralisierung bei einer bivalenten Interaktion mit HA verhindern kann.

Durch eine Darstellung von sechs verschiedenen PNA- α -2-6-SLN-Varianten (Tabelle 24), die sich in ihrer Komplementaritätssequenz gegenüber dem DNA-Templat unterscheiden, konnten somit Rezeptorabstände zwischen 23 und 101 Å eingestellt werden. Ein PNA-DNA-Komplex mit nur einer zuckertragenden PNA diene als monovalente Referenz.

Zur Bestimmung einer Abstands-Affinitätsbeziehung wurden zunächst HAI-Experimente mit den PNA-DNA-Komplexen gegenüber A/X31 (H3N2) durchgeführt (Abbildung 27 B und Tabelle 23). Dabei zeigten bivalente Komplexe mit einem Rezeptorabstand zwischen 52 und 68 Å ein Optimum bei der Hämagglutinationsinhibition von Viren. Der niedrigste KiHAI-Wert (44 μ M) konnte mit Gerüsten, die eine Rezeptorseparierung von 59 Å ermöglichen, bestimmt werden. Bis auf eine Ausnahme führten Abstände größer als 68 Å und kleiner als 52 Å unterhalb einer getesteten Inhibitorkonzentration von 500 μ M zu keiner nachweisbaren Hämagglutinationsinhibition. Experimente mit den monovalenten Trisacchariden α -2-6-SLN und α -2-6-SL zeigten mit KiHAI-Werten von 60 mM bzw. 50 mM ein weit geringeres Inhibitionspotential. Auch das rezeptorfreie PNA-DNA-Gerüst (Ko) und der monovalente Binder NA_m führten bis zu einer getesteten Konzentration von 2 mM zu keiner Inhibition in HAI-Experimenten.

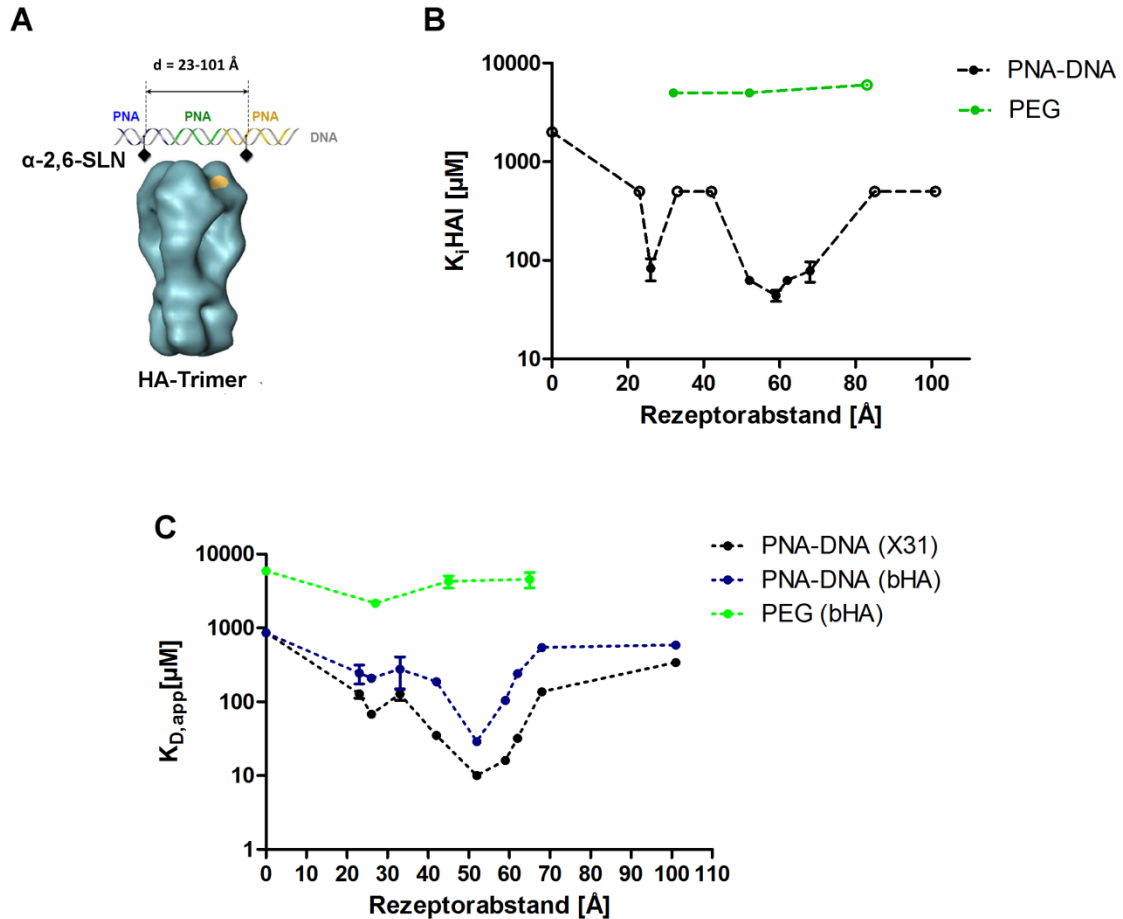


Abbildung 30: Rezeptorabstands-Affinitätsbeziehung für bivalente Binder gegenüber A/X31 (H3N2) und bHA. A) Bindungsmodell von bivalenten PNA-DNA-Komplexen an ein HA-Trimer. Verschiedene PNA-DNA-Komplexe (Tabelle 24) tragen je zwei α -2,6-SLN-Rezeptoren in Abständen zwischen 23 und 101 \AA . B) $K_i \text{HAI}$ -Werte aus HAI-Experimenten mit bivalenten PNA-DNA- und PEG-Bindern. Als Referenz wurden Messungen mit einem monovalenten PNA-DNA-Komplex durchgeführt. Die offenen Kreise repräsentieren die maximal eingesetzte Inhibitorkonzentration, bei welcher keine Hämagglutinationsinhibition nachgewiesen werden konnte. C) $K_{D,app}$ -Werte aus MST-Messungen mit monovalenten und bivalenten PNA-DNA- bzw. PEG-Bindern gegenüber R18-markierten A/X31 (H3N2) Viren und bHA. Dargestellt sind Mittelwerte mit dem SEM ($N \geq 3$). Die zugehörigen Bindungskurven sind in Abbildung S3 und die daraus resultierenden $K_{D,app}$ -Werte in Tabelle 23 dargestellt.

Bemerkenswerterweise zeigte der bivalente Binder NA_{26} in HAI-Experimente eine Hämagglutinationsinhibition mit einem $K_i \text{HAI}$ von 83 μM . Dieses Ergebnis lässt auf das Vorhandensein einer weiteren Rezeptorbindetasche des HA mit einem kürzeren Abstand von der kanonischen SA-Bindestelle (Abbildung 2) schließen.

Um das Vorliegen einer direkten Bindungsinteraktion zwischen den bivalenten Bindern und den Influenzaviren bzw. HA weiter zu untersuchen, wurden außerdem Affinitätsmessungen mit der MST durchgeführt: Zu diesem Zweck wurden die bivalenten Komplexe gegen R18 markierten A/X31 (H3N2) oder Alexa647-Fluorophor markiertem Bromelain verdautem HA (bHA) aus diesem Virus titriert und anhand der erhaltenen Thermophoresekurven $K_{D,app}$ -Werte bestimmt

(Abbildung 30 C). Insgesamt zeigte sich anhand der MST-Messungen eine höhere Affinität der bivalenten Komplexe gegen Viren im Vergleich zu bHA. Ähnlich zu den Ergebnissen aus HAI-Experimenten konnten zwei Affinitätsoptima bei einer bivalenten Interaktion von PNA-DNA-Heteroduplexe mit passendem Rezeptorabstand und bHA bzw. intakten Viren bestimmt werden. Ein ausgeprägtes Optimum konnte bei einem Rezeptorabstand von 52 Å mit $K_{D,app}$ -Werten von 10 µM und 29 µM für A/X31 (H3N2) respektive bHA identifiziert werden. Im Vergleich zu Messungen mit A/X31 (H3N2) ließ sich aus Messungen mit bHA ein schmales bzw. definiertes Optimum der Rezeptorseparierung bestimmen (Abbildung 30 C). Analog zu den HAI-Ergebnissen zeigten Rezeptorabstände oberhalb und unterhalb des optimalen Bereichs geringere Affinitätswerte gegenüber den beiden viralen Zielstrukturen. Auch hier konnte für den NA₂₆ Binder ein weiteres, jedoch geringer ausgeprägtes Bindungsoptimum identifiziert werden.













Durch einen Vergleich von $K_{D,app}$ -Werten aus MST-Messungen mit dem monovalenten Binder (α -2-6-SLN) konnten mit dem Binder NA₅₂ Verstärkungseffekte um das 176-fache oder 107-fache gegenüber intakten Viren oder bHA bestimmt werden (Tabelle 23). Affinitätsmessungen mit dem monovalenten Binder NA_m demonstrierten gegenüber bHA eine ca. 3- bis 4-fach höhere Affinität im Vergleich zu dem gerüstfreien Rezeptor. Folglich leistet das PNA-DNA-Gerüst einen zusätzlichen energetischen Beitrag bei der Bindung von α -2-6-SLN an HA. Für das Nukleinsäure-Gerüst allein ließ sich jedoch keine Bindung an bHA oder an A/X31 (H3N2) nachweisen.

Auf Basis dieser experimentellen Daten konnte gezeigt werden, dass über eine bivalente Rezeptorpräsentation auf starren PNA-DNA-Trägersystemen ein Bivalenzeffekt bei der Bindung und eine Abstands-Affinitätsbeziehung bei der Interaktion mit IAV oder deren Bindungsprotein HA gewonnen werden konnte. Demzufolge eignen sich diese Gerüstformen hervorragend, um Bindungs epitope mit Ångströmauflösung zu identifizieren.

Um den Vorzug einer starren Rezeptorpräsentation bei der Bindung an HA zu demonstrieren, wurde im Folgenden ein Vergleich mit flexiblen, bivalentem α -2-6-SLN tragendem Polyethylenglycolgerüsten (PEG) durchgeführt. In Wasser bildet PEG aufgrund seiner hohen Faltungstendenz globuläre Strukturen aus. Für die Beschreibung der Abstände der PEG-Kettenenden (r_{ete}) zueinander entwickelte Paul Flory folgenden Zusammenhang: $r_{ete} = a_F * N^{3/5}$ (Flory 1953). Der Abstand PEG-Kettenenden ist hierbei proportional zu der Anzahl an Monomeren (N). Als Proportionalitätsfaktor für gefaltetes PEG wurde ein Radius a_F von 4 Å in wässriger Lösung angenommen. Für PEG mit 27, 67 oder 144 Monomeren kann damit r_{ete} von 29, 50 und 79 Å bestimmt werden. Diese Binder erzielten in HAI-Experimenten lediglich millimolare KiHAI-Werte (Abbildung 30 A und Tabelle 23) und im Vergleich zu den PNA-DNA-Bindern konnten

keine Abstandsoptima identifiziert werden. Vielmehr sorgten längere PEG-Ketten für ein abnehmendes Bindungspotential. Der PEG-Kontrollbinder ($\text{PEG}_{\text{m}0}$), sowie die beiden monovalenten Binder $\text{PEG}_{\text{m}1}$ und $\text{PEG}_{\text{m}2}$ konnten keine Hämagglutination inhibieren. Anhand von MST-Messungen mit den PEG-Bindern gegenüber bHA konnte ebenfalls dieser Trend beobachtet werden: Für die PEG-Binder konnten millimolare $K_{\text{D,app}}$ -Werte bestimmt werden, wobei PEG_{29} mit einem $K_{\text{D,app}}$ -Wert von 2,2 mM die höchste Affinität aufwies (Abbildung 30 C und Tabelle 23). Mit zunehmender PEG-Kettenlänge nahm auch die Affinität ab. Da der monovalente Binder $\text{PEG}_{\text{m}1}$ mit einer Dissoziationskonstante von 5,9 mM eine schwächere Affinität zu HA als die bivalenten Binder aufwies, kann von einem bivalenten Verstärkungseffekt (Bivalenzeffekt) ausgegangen werden.

Tabelle 23: Übersicht ermittelter Inhibitions- und Affinitätswerte für bivalente PNA-DNA-Sialoside gegenüber A/X31 (H3N2). Aufgelistet sind KiHAI-Werte aus HAI-Experimenten und Dissoziationskonstanten ($K_{D,app}$) aus MST-Messungen mit PNA-DNA basierten Sialosiden oder dem monovalenten Rezeptor α -2,6-SLN gegenüber intakten Influenzaviren des Typs A/X31 (H3N2). MST-Messungen wurden auch mit aufgereinigtem, Bromelain verdautem Hämagglutinin (bHA) aus A/X31 (H3N2) durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte mit ihrem SEM ($N \geq 3$). n.b.= nicht bestimmt. k.B. = keine Bindung. Alle Substanzen wurden von Victor Bandlow (HU Berlin) synthetisiert.

Substanz	Rezeptor- abstand [Å]	KiHAI [μ M]	$K_{D,app}$ [μ M] A/X31 (H3N2)	$K_{D,app}$ [μ M] bHA
α -2,6-SLN	Monovalent	60000	1760 \pm 340	3100 \pm 250
α -2,6-SL	Monovalent	50000	n.b.	n.b.
 ,Ko	Kontrolle	>2000	k.B.	k.B.
 ,NA _m	Monovalent	>2000	n.b.	863 \pm 67
 ,NA ₂₃	23	>500	128 \pm 33	n.b.
 ,NA ₂₆	26	83 \pm 21	68 \pm 7	208 \pm 18
 ,NA ₃₃	33	>500	127 \pm 46	277 \pm 183
 ,NA ₄₂	42	>500	35 \pm 4	187 \pm 15
 ,NA ₅₂	52	63 \pm 0	10 \pm 1	29 \pm 5
 ,NA ₅₉	59	44 \pm 6	16 \pm 2	104 \pm 11
 ,NA ₆₂	62	63 \pm 0	32 \pm 5	240 \pm 15
 ,NA ₆₈	68	78 \pm 18	136 \pm 21	543 \pm 79
 ,NA ₈₅	85	>500	n.b.	n.b.
 ,NA ₁₀₁	101	>500	340 \pm 42	588 \pm 47
PEG _{m0}	Kontrolle	n.b.	n.b.	k.B.
PEG _{m1} (x \approx 3)	Monovalent	n.b.	n.b.	5895 \pm 631
PEG _{m2} (x \approx 45)	Monovalent	n.b.	n.b.	k.B.
PEG ₂₉ (x \approx 27)	29	5000	n.b.	2163 \pm 66
PEG ₅₀ (x \approx 67)	50	5000	n.b.	4273 \pm 1397
PEG ₇₉ (x \approx 144)	79	>6000	n.b.	4563 \pm 1891

Im nächsten Schritt wurde der Frage nachgegangen, ob der gegen A/X31 (H3N2) als optimal bestimmte Binder NA₅₉ aus HAI-Experimenten auch andere IAV-Stämme inhibieren kann. Für einen Nachweis wurden zwei weitere humanpathogene IAV-Stämme (A/Panama (H3N2) und A/Puerto Rico (H1N1)) und der aviärpathogene Stamm A/mute swan/Rostock (H7N1) für HAI-Experimente herangezogen.

Um eine Interaktion dieser IAV-Stämme mit dem monovalenten Rezeptor zeigen zu können, wurden zunächst HAI-Versuche in Gegenwart von α -2,6-SL durchgeführt. Dabei konnten für die beiden humanpathogenen Stämme millimolare HAI-Werte bestimmt werden, während für A/mute swan/Rostock (H7N1) keine Bindungsinhibition bis zu einer getesteten Konzentration von 50 mM festgestellt werden konnte (Tabelle 24). Dieses Ergebnis lässt sich auf die rezeptorspezifische Diskriminierung zwischen human- und aviärpathogenen IAV-Stämmen (Abschnitt 1.1.4) zurückführen. Für den bivalenten Binder NA₅₉ konnte gegenüber A/Panama (H3N2) ein KiHAI-Wert von 63 μ M ermittelt werden. A/Puerto Rico (H1N1) und A/mute swan/Rostock (H7N1) konnten mit diesem Rezeptorabstand nicht inhibiert werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass nicht nur der Rezeptor, sondern auch der Rezeptorabstand eine wichtige Rolle bei der Serospezifität spielt.

Tabelle 24: Untersuchung der Spezifität von NA₅₉ gegenüber verschiedenen IAV-Stämmen. Dargestellt sind KiHAI-Werte zusammen mit dem SEM ($N \geq 3$).

IAV-Stamm	Rezeptor-präferenz	K _i HAI [μ M] (NA ₅₉)	K _i HAI [μ M] (α -2,6-SL)
A/X31 (H3N2)	α -2,6-SL	44	50000
A/Panama (H3N2)	α -2,6-SL	63	50000
A/Puerto Rico (H1N1)	α -2,6-SL/ α -2,3-SL	>500	50000
A/mute swan/Rostock (H7N1)	α -2,6-SL	>500	>50000

Nachdem nun anhand von HAI-Experimenten ein Rezeptorabstand von 59 Å als optimal für eine bivalente Interaktion mit HA aus A/X31 (H3N2) gezeigt werden konnte, wurde im Folgenden der Frage nachgegangen, ob durch eine mehrfache Präsentation solcher Rezeptorgruppen auf einem Trägersystem noch bessere Inhibitionswerte erzielt werden können. Zu diesem Zweck wurden 59 Å separierte, bivalente Rezeptoreinheiten auf einer ca. 48 kb Einzelstrang-DNA (PolyDNA) aufgebaut. Die PolyDNA konnte über eine „rolling circle-Amplifikation“ aus einem Plasmid mit bekannter Basensequenz gewonnen werden. Für die Bestimmung einer optimalen Rezeptordichte wurden hierfür α -2,6-SLN-PNA-Sets, die bivalente Rezeptorabstände von 59 Å auf der PolyDNA gewährleisten, gegen 1 μ g PolyDNA titriert und für HAI-Experimenten mit A/X31 (H3N2) verwendet (Abbildung 31 A). Dabei stellte sich heraus, dass eine zunehmende Menge an PNA bei der Hybridisierung mit PolyDNA zu geringeren KiHAI-Werten führte. Bei der Zugabe von 3 nmol PNA wurde ein KiHAI-Wert von 0,17 nM bestimmt. Im Vergleich zu dem bivalenten Binder NA₅₉, welcher einen Inhibitionswert von 44 μ M aufwies, konnte mit PolyDNA-PNA-NA₅₉ ein 260.000-fach geringerer Inhibitionswert bestimmt werden (Abbildung 31 B). In HAI-Experimenten mit α -2,6-SLN-PNA-Sets, die Abstände auf PolyDNA von 42 Å ermöglichten, konnte bis zu einer getesteten Konzentration von 500 nM PNA keine Inhibition von IAV gemessen werden.

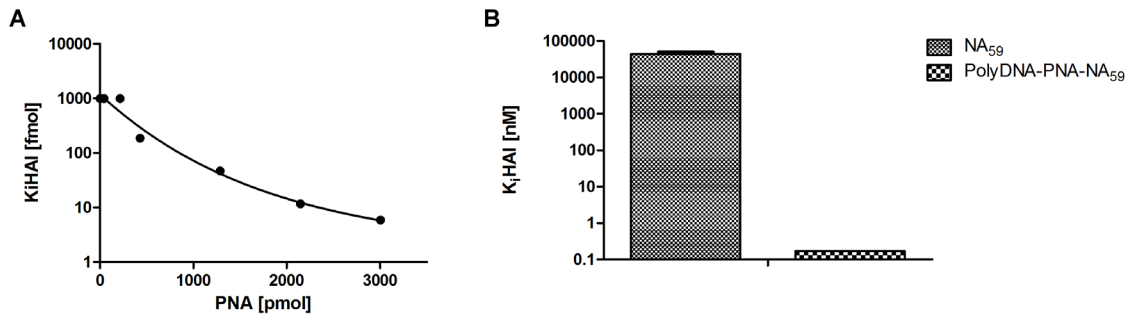


Abbildung 31: HAI-Messungen mit dem bivalenten Binder NA₅₉ und dessen multivalenter Präsentation auf PolyDNA. A) KiHAI-Werte aus Messungen mit A/X31 (H3N2) in Gegenwart von PolyDNA und unterschiedlichen Mengen an α -2,6-SLN tragender PNA. Die Datenpunkte wurden mit einer einfachen Exponentialfunktion angepasst. B) Vergleich des bivalenten Binders NA₅₉ mit PolyDNA, die mehrere NA₅₉-Einheiten präsentiert (1 μ g DNA mit 3 nmol α -2,6-SLN-PNA-Set). Dargestellt sind Mittelwerte mit dem SEM ($N \geq 3$).

Zusammenfassend konnte in diesem Abschnitt eine Abstands-Affinitätsbeziehung bei einer bivalenten Interaktion von PNA-DNA-Sialosiden und IAV bzw. bHA identifiziert werden. Aus HAI-Experimenten ging hervor, dass bivalente Binder mit einem Rezeptorabstand von 26 oder 59 Å zu einer effizienten Inhibition von IAV führen. Ein ähnlicher Trend ließ sich anhand von MST-Messungen ausmachen: Hier konnte gezeigt werden, dass eine direkte Interaktion dieser beiden Binder mit bHA jeweils ein Bindungsoptimum innerhalb des getesteten Rezeptorabstandsbereichs (23-101 Å) aufwiesen. Darüber hinaus wurde mit dem Binder NA₅₉ eine Korrelation zwischen dem Rezeptorabstand und der Serospezifität identifiziert. Über eine multiple Präsentation der bivalenten Rezeptoreinheit NA₅₉ auf PolyDNA war es möglich, nanomolare Inhibitionswerte mit einem hohen Verstärkungsfaktor zu ermitteln.

4.4.2 Bestimmung einer Abstands-Affinitätsbeziehung mit PeB-PNA-Konjugaten

Im folgenden Abschnitt wurde untersucht, ob sich durch eine bivalente Präsentation auf des Antikörperpeptids PeB auf PNA-DNA-Gerüsten ein Verstärkungseffekt erzielen lässt und ob auch in diesem Fall eine Abstands-Affinitätsbeziehung besteht.

Anhand der Kristallstruktur des Komplexes aus dem Antikörper HC19 und HA aus A/X31 (H3N2) ist die potentielle Bindestelle des Peptids PeB aus dem Antikörper bekannt (Abbildung 10). Diese befindet sich ca. 0,75 Å lateral der SA-Rezeptorbindestelle (Abbildung 32 A). Ob PeB tatsächlich an dieser Stelle oder eventuell an einer anderen Position an HA bindet, konnte bisher nicht gezeigt werden. Auch eine Bindung an mehrere Regionen an HA ist nicht auszuschließen. Um die Bindungsregion der löslichen Form von PeB zumindest eingrenzen zu können, wurden zwei PeB-Peptide auf einem PNA-DNA-Trägersystem in drei räumlich definierten Abständen (26, 59 und 101 Å) zueinander immobilisiert. Eine bessere Löslichkeit

der bivalenten PNA-DNA-PeB-Konjugate wurde durch ein Anfügen von zwei Lysinmonomeren am N-Terminus von PeB erreicht.

Diese bivalenten Peptid-Nukleinsäurekonjugate wurden für Affinitätsmessungen mit dem MST-Verfahren gegenüber Bromelain verdautem HA (bHA) herangezogen (Abbildung 32 B).

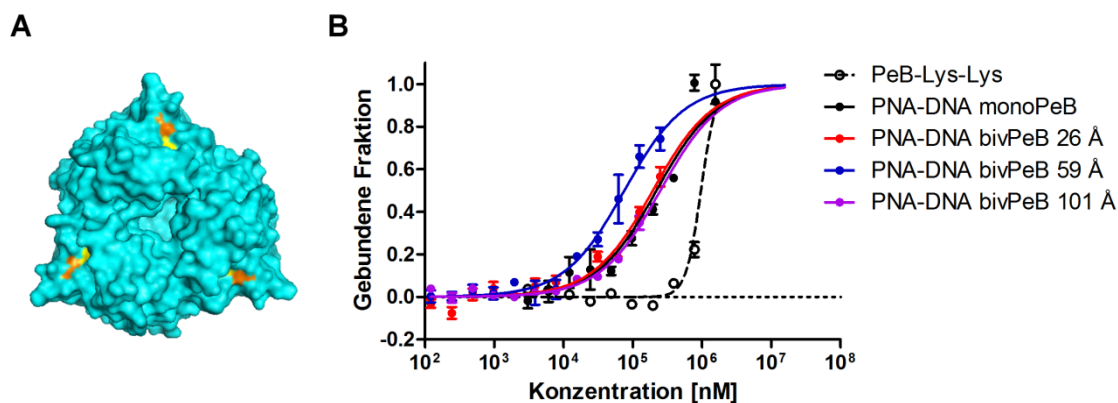


Abbildung 32: Ermittlung einer Abstands-Affinitätsbeziehung mit bivalenten PeB-PNA-DNA-Konjugaten gegenüber HA A) Kristallstruktur von HA aus A/X31 (H3N2) (PDB:2vir). Hervorgehoben sind die bekannten Rezeptorbindestellen für SA (gelb) und die potentiellen Bindestellen von PeB (orange). B) MST-Messungen mit mono- und bivalenten PeB-Bindern gegenüber Alexa647 fluoreszenzmarkiertem bHA. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen mit SEM. Die Datenpunkte wurden gemäß der Funktion für das Massewirkungsgesetz (Abschnitt 3.2.19) angepasst, um $K_{D,app}$ -Werte bestimmen zu können (Tabelle 25).

Aus MST-Messungen mit dem monovalenten Peptid PeB-Lys-Lys konnte ein $K_{D,app}$ -Wert von 1,2 mM bestimmt werden (Abbildung 32 B und Tabelle 25). Für PNA-DNA-Gerüste mit einem Peptid und für die bivalenten Binder bivPeB 26 und bivPeB 101 konnten ähnliche Dissoziationskonstanten (195-250 μ M), wie mit dem monovalenten Peptid PeB-Lys-Lys bestimmt werden. Diese Binder zeigten damit ca. 6-fach höhere Affinitätswerte als das gerüstfreie Peptid PeB-Lys-Lys (Tabelle 25). Da sich die bivalenten Binder bivPeB 26 und bivPeB 101 kaum von derjenigen des monovalenten Binders monoPeB unterscheiden, kann ein bivalenter Verstärkungseffekt bei der Bindung an HA ausgeschlossen werden. Für den bivalenten Komplex bivPeB 59 hingegen konnte ein $K_{D,app}$ -Wert von ca. 76 μ M bestimmt werden. Damit zeigte sich ein deutlicher Verstärkungseffekt bei der Bindung an bHA. Dieser Befund legt eine Interaktion des bivalenten Binders bivPeB 59 mit den potentiellen Bindestellen (Abbildung 32 A) nahe, da für eine Verbrückung zweier Bindungs epitope für PeB innerhalb eines HA-Trimers ein ähnlicher Abstand (ca. 54 Å) benötigt wird, wie für die bivalenten Sialoside aus Abschnitt 4.4.1.

Tabelle 25: $K_{D,app}$ -Werte aus MST-Messungen mit mono- und bivalenten PNA-DNA-PeB-Konjugaten. Aufgezeigt sind $K_{D,app}$ -Werte aus MST-Messungen mit fluoreszenzmarkiertem bHA von monovalenten und bivalenten PNA-DNA-PeB-Komplexen oder PeB-Lys-Lys allein. In Klammern ist der SEM (N=3) dargestellt.

Komplex	$K_{D,app}$ [μM]
PeB-Lys-Lys	1194 (\pm 294)
PNA-DNA monoPeB	220 (\pm 41)
PNA-DNA bivPeB (26 Å)	195 (\pm 13)
PNA-DNA bivPeB (59 Å)	76 (\pm 4,6)
PNA-DNA bivPeB (101 Å)	250 (\pm 11,7)

Zusammenfassend konnte durch eine bivalente Präsentation von PeB auf einem PNA-DNA-Gerüst eine Abstands-Affinitätsbeziehung bestimmt werden. Eine Rezeptorseparierung von 59 Å führte zu einem Verstärkungseffekt in der Bindung an bHA. Eine Abweichung von diesem Rezeptorabstand führte hingegen zu keiner Verbesserung des monovalenten Binders mit Nukleinsäuregerüst.

4.4.3 Multivalente Präsentation von Sialosiden auf Q β -Phagenkapsiden zur Hemmung von IAV

Eine weitere Möglichkeit für eine starre Rezeptorpräsentation bieten Q β -Phagenkapside. Sie bestehen aus 180 Proteinuntereinheiten, die nach einer rekombinanten Herstellung selbstassemblieren und ein formstabiles Proteingerüst mit einem Durchmesser von ca. 28 nm bilden. Das aus einer vorausgehenden Arbeit bekannte auxotrophe Expressionssystem K16HPG für Q β -Phagenkapsidproteine ermöglicht über den Austausch von Lysin durch L-Homopropargylglycin (HPG) an der Oberfläche des assemblierten Phagenkapsids eine Konjugation an beliebige chemische Gruppen (Abbildung 33 A) ([Ribeiro-Viana, Sanchez-Navarro et al. 2012](#)). In diesem konkreten Fall wurden Alkylgruppen von HPG über eine CuACC-Reaktion für eine kovalente Verknüpfung mit Sialosidaziden genutzt. Nichtkonjugierte Q β -Phagen (Q β [HPG]) und solche, die Galactose anstelle von Sialinsäure tragen, dienten als Kontrollbinder (Abbildung 33 B). Die homogene Rezeptorverteilung auf einem assemblierten Q β -Phagenkapsids ermöglicht eine multiple trivalente Rezeptorpräsentation (Kantenlängen ca. 5-6 nm), die für eine Interaktion mit HA genutzt werden kann (Abbildung 33 A). Für eine trivalente Bindung an HA des Typs A/X31 (H3N2) ist ein Abstand von ca. 4,7 nm zwischen den SA-Bindetaschen erforderlich.

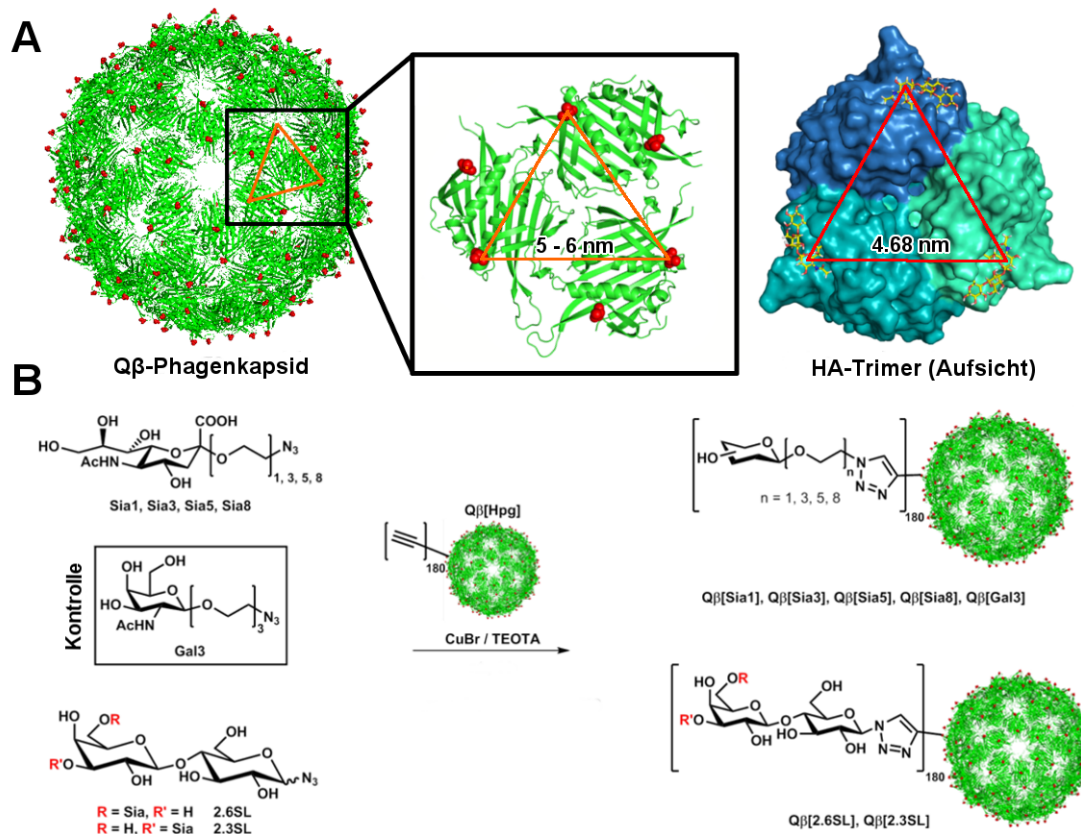


Abbildung 33: Darstellung eines Qβ-Phagenkapsids mit verschiedenen Rezeptoren für eine trivalente Interaktion mit HA. A) Phagenkapsidtopologie mit Rezeptorpositionen (rot). Hervorhebung (rote Dreiecke) der Rezeptorabstände auf dem Phagenkapsid und der Abstände der SA-Bindetaschen auf HA (rechtes Bild). B) Darstellung der verschiedenen Rezeptortypen und deren chemische Verknüpfung an HPG auf den Phagenkapsiden über eine CuACC-Reaktion. Die rekombinante Herstellung der Qβ-Phagenkapside wurde von Saba Nojoudi (TU Berlin) und die Funktionalisierung der Phagenkapside wurde von Simon Klenk (FMP Berlin) bewerkstelligt. Die Abbildung wurde von Simon Klenk erstellt.

Abzielend auf eine optimale trivalente Bindung eines Phagenkapsids an HA wurden SA-Rezeptoren mit unterschiedlichen Ethylenglycol-(EG)-Linkerlängen (1, 3, 5, 8) synthetisiert und für Bindungstests herangezogen. Eine Immobilisierung von SA ohne EG-Linker führte zu deformierten Phagenkapsiden, weswegen diese Kapsidvariante für Messungen nicht verwendet wurde.

Zunächst wurde das Inhibitionspotential der verschiedenen funktionalisierten Phagenkapside in HAI-Experimenten gegenüber A/X31 (H3N2) Viren untersucht (Abbildung 34 A). Dabei stellte sich heraus, dass eine kürzere Linkerlänge zu einer höheren Bindungsinhibition führt. Für Qβ[Sia1] konnte ein KiHAI-Wert von 1,3 nM bestimmt werden. Für Phagenkapside, die SA über längere EG-Linker präsentieren wurden höhere bzw. schwächere KiHAI-Werte gemessen (Tabelle 26). Die beiden Kontrollbinder Qβ[HPG] und Qβ[Gal3] konnten bis zu einer getesteten Konzentration von 500 nM keine nachweisbare Inhibition verursachen.

Eine Interaktion von SA-tragenden Phagenkapsiden mit Influenzaviren konnte auch anhand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen nachgewiesen werden (Abbildung S4). Analog zu den Ergebnissen aus den HAI-Experimenten zeigten Kapsidvarianten, die SA über kurze Linker präsentieren, ein höheres Bindungspotential zu A/X31 (H3N2) Viren auf als solche Binder, die SA über längere Linker tragen. Das Bindungspotential zeigte sich anhand der Häufigkeit einer Bindung von Phagenkapsiden an HA der Virushülle. Zur Kontrolle wurden unfunktionalisierte Phagenkapside oder solche, die Galactose tragen verwendet. Für die Kontrollbinder konnte keine Interaktion mit Influenzaviren nachgewiesen werden.

Um nachweisen zu können, ob auch einzelne HA-Trimere in der Lage sind mit Phagenkapsiden zu interagieren, wurde bHA mit dem Phagenkapsid Q β [Sia1] inkubiert und mittels der Elektronenmikroskopie untersucht. Aus diesen Aufnahmen konnte das Vorliegen einer Interaktion von bHA mit den Kapsiden nachgewiesen werden (Abbildung S5). Durch Aufsummierung mehrerer Einzelaufnahmen von HA-Kapsidkomplexen zeigte sich eine charakteristische, gleichmäßige Verteilung der HA-Trimere auf den Kapsiden. Dieser Befund legt nahe, dass sich die Interaktion der Phagenkapside mit HA auf eine trimere Interaktion zurückführen lässt.

Neben dem Influenzastamm A/X31 (H3N2) wurden auch andere Influenzastämme für HAI-Experimente mit den Q β -Phagenkapsiden untersucht. Die beiden H3N2-Stämme A/mallard (H3N2) und A/Panama (H3N2) konnten nur mit dem Q β [Sia1] inhibiert werden (KiHAI = 3,1 nM bzw. 25 nM), jedoch nicht mit Phagenkapsiden, die SA über einen längeren Linker präsentieren (Tabelle 27). Gegenüber den H1N1-Stämmen A/Puerto Rico (H1N1) und A/WSN (H1N1) konnten ähnliche Inhibitionswerte (KiHAI = 25-50 nM bzw. 12,5 nM) mit den Phagenkapsiden Q β [Sia3-8] bestimmt werden. Das Phagenkapsid Q β [Sia1] zeigte keine Hemmung der Hämagglutination dieser beiden IAV-Stämme. Der aviäre Stamm A/teal/Germany (H5N1) und das Influenza B Virus (B/Thüringen) konnten mit keinem dieser Q β -Phagenkapsiden inhibiert werden. Diese Ergebnisse deuten auf eine Abhängigkeit des Rezeptorabstands bei der Interaktion mit bestimmten IAV-Serotypen hin.

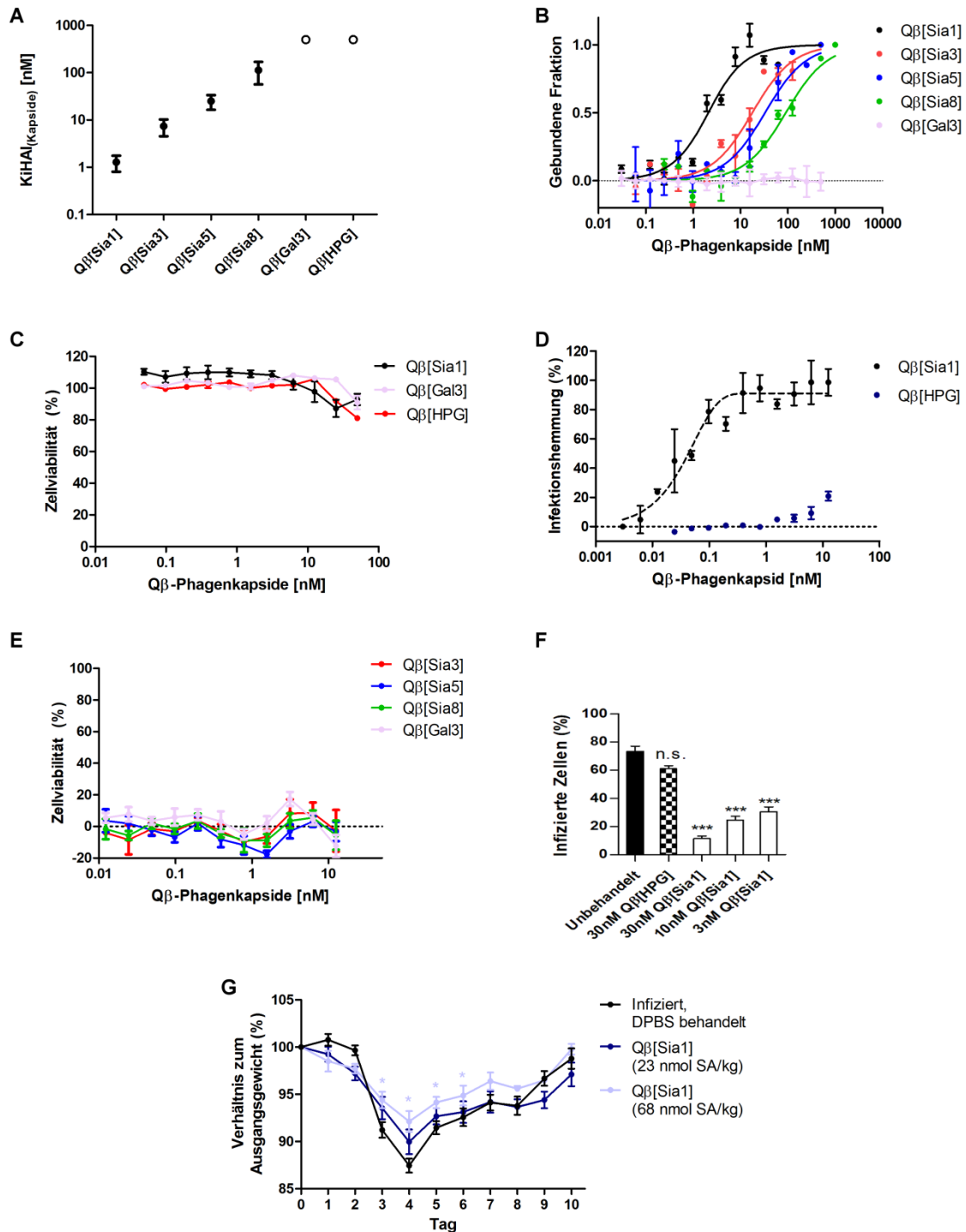


Abbildung 34: Bindungs-, Affinitäts-, Infektionsinhibitionsexperimente zur Charakterisierung der Interaktion von Qβ-Phagenkapsiden mit A/X31 (H3N2). A) KiHAI-Werte aus HAI-Experimenten mit Phagenkapsiden, die SA über unterschiedliche EG-Linkerlängen präsentieren. Die dargestellten KiHAI-Werte beziehen sich auf die Kapsidkonzentration. Ungefüllte Kreise zeigen die maximal eingesetzte Phagenkapsidkonzentration ohne nachweisbare Inhibition. B) Mittelwerte aus MST-Messungen mit verschiedenen Phagenkapsiden gegenüber R18-markierten A/X31 (H3N2) Viren. Die Datenpunkte wurden mittels der Funktion für das Massenwirkungsgesetz angepasst. Ergebnisse aus HAI- und MST-Messungen sind in Tabelle 26 aufgelistet. C) Ergebnisse aus Zellviabilitäts mit MDCK-II Zellen 24 h nach Exposition mit ausgewählten Phagenkapsiden. Mittelwerte aus Infektionsinhibitionsexperimente

mit D) Q β [Sia1] und Q β [HPG] Phagenkapsiden oder E) Q β [Sia3-8] und Q β [Gal3] gegenüber A/X31 (H3N2). A549 Zellen wurden mit Inhibitor behandelten A/X31 (H3N2) Viren (MOI 0,05) für 24 h infiziert und anschließend wurde mit einem CellTiter-Glo-Lumineszenz-Kit (Promega) die Zellviabilität bestimmt. Für die Ermittlung eines IC₅₀-Wertes wurden die Datenpunkte aus Messungen mit Q β [Sia1] über eine 4-parametrische, logarithmische Funktion angepasst. F) Quantifizierung von A/Panama (H3N2) infizierten A549 Zellen (MOI 1) anhand des NP^{IAV}-Signals. A/Panama (H3N2) wurde mit Q β [Sia1] oder Q β [HPG] bei angegebenen Konzentrationen vorbehandelt und dann für die Infektion von A549 Zellen (24 h) verwendet. Die Quantifizierung der infizierten Zellen wurde über die Bildanalysesoftware ImageJ von Mikroskopiebildern durchgeführt (Abbildung S6). G) Ergebnisse aus *in vivo* Infektionsinhibitionsexperimente mit BALB/c Mäusen, die mit Phagenkapsid behandelten A/X31 (H3N2) Viren (100 pfu) infiziert wurden. Als Maß für die Infektion wurde der infektionsbedingte Gewichtsverlust über einen Zeitraum von 10 Tagen beobachtet. Dargestellt sind die Mittelwerte des zum Ausgangsgewicht relativen Gewichtsverlusts. Die Fehlerbalken in Abbildung 34 zeigen den SEM (N \geq 3). Zur Bestimmung von Signifikanz wurden die Datenpunkte mittels einer Ein-Weg-ANOVA statistisch ausgewertet und mit einem Vergleichstest nach Dunnett gegenüber der DPBS Kontrolle verglichen (*p<0,05).

Als nächstes wurde die Affinität der Phagenkapside gegenüber A/X31 (H3N2) über MST-Messungen bestimmt. Analog zu den Ergebnissen aus dem HAI-Test wies das Q β [Sia1]-Phagenkapsid gegenüber R18 markierten A/X31 (H3N2) Viren mit einem K_{D,app}-Wert von 1,6 nM die höchste Affinität auf (Tabelle 26). Phagenkapside mit längeren EG-Linkern zeigten eine geringere und der Kontrollbinder Q β [Gal3] keine Affinität gegenüber den Viren auf.

Tabelle 26: Affinitäts- und Inhibitionswerte aus MST- und HAI-Experimenten. Dargestellt sind KiHAI- und K_{D,app}-Werte aus Messungen verschiedener Phagenkapsidvarianten gegenüber A/X31 (H3N2). Die Fehler verweisen auf den SEM (N \geq 3).

Q β -Phagenkapsid	KiHAI [nM]	K _{D,app} [nM]
Q β [Sia1]	1,3 (\pm 0,5)	1,6 (\pm 0,2)
Q β [Sia3]	7,4 (\pm 2,9)	17,3 (\pm 3,0)
Q β [Sia5]	25,0 (\pm 8,5)	32,6 (\pm 8,4)
Q β [Sia8]	112,5 (\pm 56,1)	90,6 (\pm 12,3)
Q β [Gal3]	>500	>500

In Zellviabilitätsexperimenten verursachten die Phagenkapside bis zu einer getesteten Konzentration von 50 nM keine Toxizität in A549 Zellen, die 24 h mit den Kapsiden behandelt wurden. Auf dieser Grundlage wurden Infektionsinhibitionsexperimente mit allen Phagenkapsidvarianten innerhalb des nichttoxischen Konzentrationsbereichs durchgeführt. Die Hemmung der infektionsbedingten Zytopathogenität wurde über ein Zellviabilitätstest (CellTiter-Glo-Lumineszenz-Kit) ermittelt.

Als nächstes wurden die Phagenkapside in Infektionsexperimenten untersucht. Hierbei wurden A/X31 (H3N2) Viren mit Phagenkapsiden vorinkubiert und anschließend für eine Infektion von

A549 Zellen (MOI 0,05) über einen Zeitraum von 24 h verwendet. Dabei demonstrierte lediglich Q β [Sia1] bis zu einer getesteten Konzentration von 12,5 nM ein antivirales Potential (Abbildung 34 D und E). Für Q β [Sia1] konnte ein IC₅₀-Wert von 1,10 (\pm 0,02) nM bestimmt werden. Kontrollphagenkapside und solche mit längeren EG-Linkern konnten eine Infektion nicht beeinflussen.

Das Phagenkapsid Q β [Sia1] wurde auch in einem weiteren Infektionsinhibitionstest mit A/Panama (H3N2) Viren untersucht. Hierbei wurden die Viren zunächst mit Phagenkapsiden vorbehandelt und dann für eine Infektion von A549 Zellen (MOI 1) für einen Zeitraum von 6 h verwendet. Nach der Infektion wurde eine Immunfärbung zum Nachweis des viralen NP^{IAV}-Niveaus durchgeführt, um das Ausmaß einer Zellinfektion bestimmen zu können. Dabei zeigte sich, dass Viren, welche mit 30 nM Q β [Sia1] Phagenkapsid behandelt wurden, gerade einmal 10 % der Zellen infizieren konnten (Abbildung 34 F und Abbildung S6). Auch eine Behandlung mit geringeren Konzentrationen an Q β [Sia1] (3-10 nM) konnte immer noch zu einer signifikanten Herabsetzung der viralen Infektion verursachen. In Kontrollexperimenten mit DPBS oder Q β [HPG] behandelten Viren konnte nur eine geringfügige Reduktion an infizierten Zellen nachgewiesen werden.

Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse aus *in vitro* Messungen wurde das Q β [Sia1] Phagenkapsid auch in einem *in vivo* Modell untersucht. Analog zu den Infektionsinhibitionsstudien mit den PG basierten Bindern (Abschnitt 4.3) wurden A/X31 (H3N2) Viren (100 pfu) mit unterschiedlichen Konzentrationen an Q β [Sia1] vorinkubiert und für eine Infektion von BALB/c Mäusen verwendet. Aus diesen Experimenten ging hervor, dass Mäuse, die mit 68 nmol SA/kg behandelt wurden, an den Tagen 3-6 signifikant geringere Gewichtsverluste erlitten als solche, die mit DPBS behandelten Viren infiziert worden waren. Eine Inkubation der Viren mit einer geringeren Phagenkapsidmenge (23 nmol SA/kg) konnte keine signifikante Reduktion des infektionsbedingten Gewichtsverlustes verursachen.

Tabelle 27: KiHAI-Werte aus HAI-Experimenten mit SA präsentierenden Q β -Phagenkapside gegenüber verschiedenen Influenzastämmen. Dargestellt sind nanomolare (nM) Konzentrationswerte zusammen mit dem SEM ($N \geq 3$). Für Phagenkapside, die gegenüber bestimmten Virusstämmen keine Inhibition zeigten, ist die maximal eingesetzte Konzentration dargestellt.

Influenzastamm	Q β [Sia1]	Q β [Sia3]	Q β [Sia5]	Q β [Sia8]	Q β [Gal3]	Q β [HPG]
A/Panama (H3N2)	3,1 ($\pm 0,6$)	>100	>100	>100	>100	>100
A/mallard/Germany (H3N2)	25,0 ($\pm 4,2$)	>100	>100	>100	>100	>100
A/Puerto Rico (H1N1)	>100	25,0 ($\pm 0,0$)	25,0 ($\pm 0,0$)	50,0 ($\pm 16,7$)	>100	>100
A/WSN (H1N1)	>100	12,5 ($\pm 4,2$)	12,5 ($\pm 0,0$)	12,5 ($\pm 0,0$)	>100	>100
A/teal/Germany (H5N1)	>100	>100	>100	>100	>100	>100
B/Thüringen	>100	>100	>100	>100	>100	>100

Im nächsten Schritt wurde der SA-Rezeptor auf den Phagenkapsid durch spezifischere Influenzarezeptoren ausgetauscht. Über eine Präsentation von α -2,3-SL und α -2,6-SL auf den Phagenkapsiden wurde versucht, eine Diskriminierung von aviär- bzw. humanpathogenen IAV-Stämmen zu erreichen. Für Untersuchungszwecken wurde hierfür das Inhibitionspotential beider Phagenkapsidvarianten gegenüber vier verschiedenen Influenzaatämmen in HAI-Experimenten getestet. Anhand dieser Experimente konnte gezeigt werden, dass es mit dem Q β [2,6SL] Phagenkapsid möglich war, alle getesteten humanpathogenen Stämme zu hemmen, jedoch nicht den aviären Stamm A/teal/Germany (H5N1) (Tabelle 28). Das Q β [2,3SL] erzielte einen umgekehrten Inhibitionscharakter, indem mit ihm nur ein aviärer Stamm nicht aber die humanpathogenen Stämme gehemmt werden konnten.

Tabelle 28: KiHAI-Werte aus HAI-Experimenten mit α -2,3-SL und α -2,6-SL tragenden Q β -Phagenkapsiden. Dargestellt sind KiHAI-Werte aus Titrationsexperimenten mit Q β [2,6SL] und Q β [2,3SL] im HAI-Test. In Klammern ist der SEM ($N \geq 3$) dargestellt.

Influenzastamm	Q β [2,6SL]	Q β [2,3SL]
A/X31 (H3N2)	41,7 ($\pm 10,4$)	>250
A/WSN (H1N1)	52,1 ($\pm 10,4$)	>250
A/teal/Germany (H5N1)	>250	9,1 ($\pm 3,4$)
B/Thüringen	1,7 ($\pm 1,1$)	>250

Zusammenfassend konnte anhand von *in vitro* Experimenten gezeigt werden, dass SA-präsentierende Phagenkapside mit kurzem EG-Linker effizientere IAV-Inhibitoren darstellen. Mit dem besten Binder Q β [Sia1] konnten nanomolare Affinitäts- und Inhibitionswerte bestimmt werden. Darüber hinaus konnte für Q β [Sia1] auch in Tiermodellstudien eine Reduktion des

infektionsbedingten Gewichtsverlustes nachgewiesen werden. In Bindungsstudien mit anderen IAV-Stämmen konnte gezeigt werden, dass sich der auf Q β [Sia1] vorliegende Rezeptorabstand nicht für alle getesteten Influenzatypes im gleichen Maße eignen. Vielmehr ließ sich eine Abstandsabhängigkeit in der Rezeptorpräsentation für die Inhibition verschiedener IAV-Stämme erkennen. Außerdem war es durch die Verwendung der Rezeptoren α -2,3-SL oder α -2,6-SL möglich, eine Diskriminierung zwischen aviär- und humanpathogenen Influenzaviren zu erzielen.

4.5 Die Rolle viraler Morphologie bei der Zellbindung

Zur Untersuchung des Bindungsverhaltens von sphärischen und filamentösen Influenzaviren wurden A/Panama (H3N2) Viren, die aus einer Vermehrung in Zellen in gemischter Form gewonnen wurden, verwendet. Zur Separierung der Viren wurde die Virusernte über einen Dichtegradienten nach ihrer Morphologie aufgetrennt (Abbildung 34 A). Nach der Dichtezentrifugation konnten fünf Banden identifiziert werden. Die oberste bzw. erste Bande enthielt Zelltrümmer und wurde daher nicht weiter untersucht. Die zweite Bande im Folgenden als obere Bande bezeichnet, die dritte und vierte Bande wurde vereinigt und wird als mittlere Bande deklariert und die fünfte Bande wird als unterste Bande bezeichnet. Diese drei Fraktionen wurden dann voneinander getrennt und elektronenmikroskopisch analysiert: Die obere Bande enthielt vorwiegend zerstörte Viren mit Membranausstülpungen (Abbildung 34 A), die mittlere Bande dagegen vorwiegend sphärische und die untere Bande gehäuft filamentöse Viren.

Im nächsten Schritt wurden 5 μ g Protein einer jeder Fraktion für eine HA-Titration verwendet. Die Proteinbestimmung wurde über einen Bicinchoninsäuretest (BCA-Test) ohne Detergenz durchgeführt. Dieser Test erfasst nur die Proteinmenge auf der Oberfläche der Virionen (Abschnitt 3.2.9). Bei der HA-Titration konnten für die filamentösen Viren ein HA-Titer von 2^{14} HAU bestimmt werden, während für die mittleren Banden und die obere Bande HA-Titer von 2^9 bzw. 2^6 ermittelt werden konnten. Indem der HA-Titer mit der eingesetzten Proteinmenge ins Verhältnis gesetzt wurde, konnte für filamentöse Viren ein Verhältnis von 82.000 bestimmt werden. Für die sphärischen und nicht intakten Viren wurden Verhältnisse von ca. 2.500 bzw. 300 ermittelt. Demzufolge hämagglutinieren filamentöse Viren bei gleicher Proteinmenge effizienter als sphärische oder nicht intakte Viren.

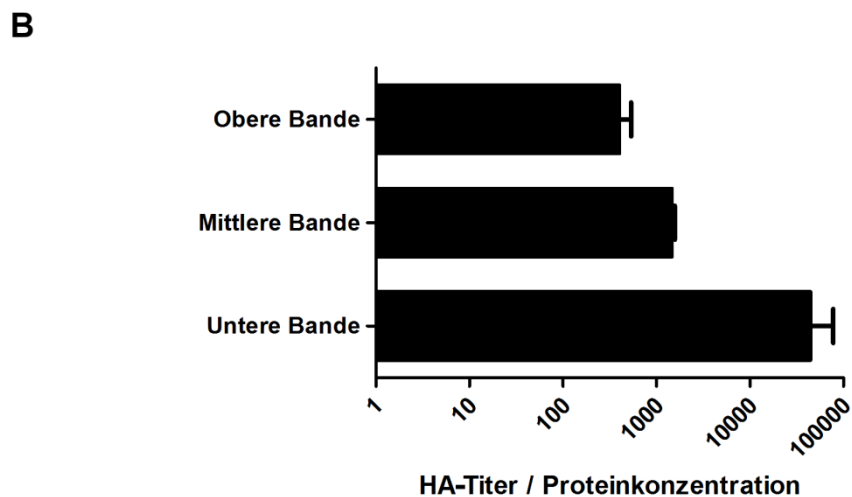
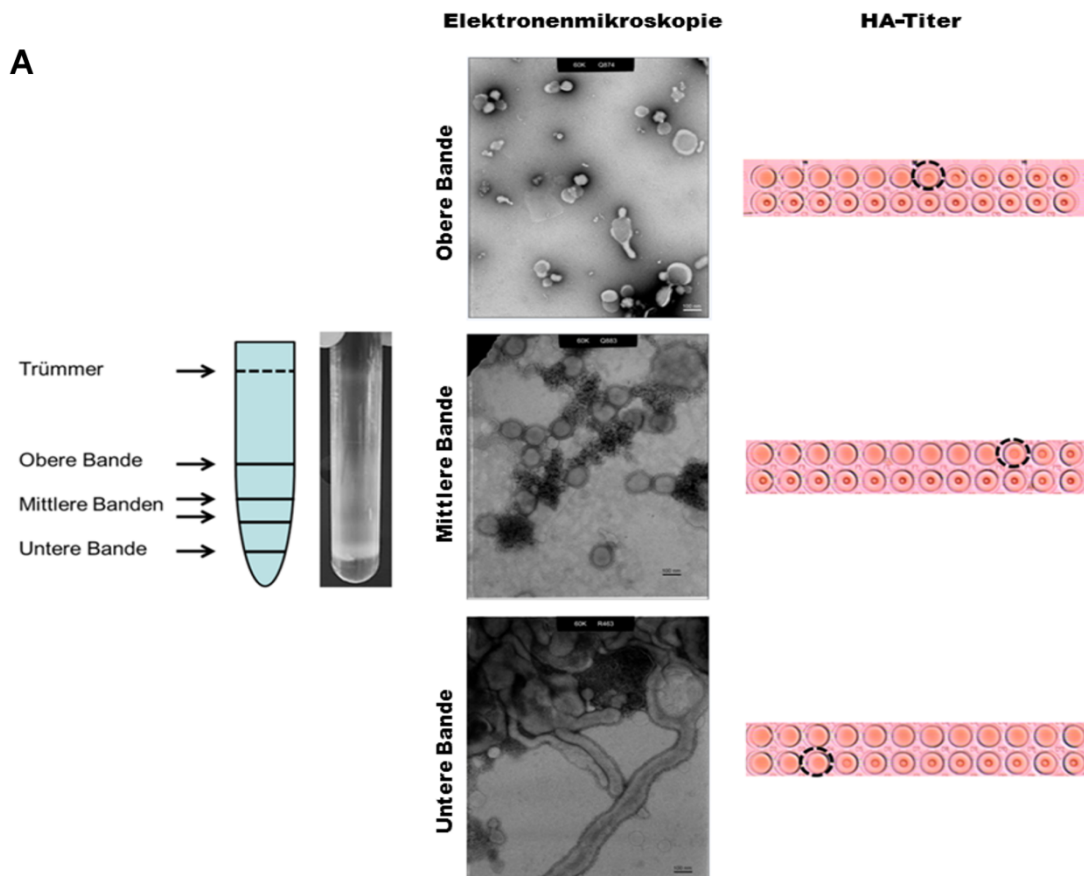


Abbildung 35: Korrelation zwischen HA-Titer und Proteinkonzentration von A/Panama (H3N2) Viren mit unterschiedlicher Morphologie. A) Auftrennung von A/Panama (H3N2) Viruskonzentrat aus Zellkulturüberstand mittels eines Dichtegradienten und Kryo-TEM-Aufnahmen der verschiedenen Proteinfraktionen (Aufnahmen wurden von Kai Ludwig an der FU Berlin erstellt). Gleiche Proteinmengen (5 µg) der oberen Bande, der zwei vereinten mittleren Banden, sowie der unteren Bande wurden zur Bestimmung des Virustiters über einen HA-Test titriert. B) Darstellung des Verhältnisses des HA-Titers zur Proteinkonzentration (0,2 µg/µl) einer jeden Bande. Die Fehlerbalken zeigen den SEM (N≥3).

Als nächstes wurde jede Virusfraktion (5 μg Protein) mit R18 markiert und mit unterschiedlichen Zelllinien (MDCK-II-, HeLa-, A549-Zellen) inkubiert, um anhand von Durchflusszytometriemessungen die mittlere Fluoreszenzintensität nach Bindung der markierten Viren an die Zellen bestimmen und quantifizieren zu können (Abbildung 36). Aus diesen Messungen ließ sich für alle Virusfraktionen anhand der Fluoreszenzintensität ein ähnliches Bindungsverhalten zu den drei getesteten Zelllinien beobachten: Während für die untere Bande eine schwache Fluoreszenzintensität bestimmt werden konnte, zeigten die Virusfraktionen der mittleren und oberen Banden höhere Fluoreszenzintensitäten. Demzufolge wiesen die verschiedenen Virusfraktionen bzw -morphologien keine Präferenz gegenüber den getesteten Zelllinien auf. Da die Fluoreszenzintensität stellvertretend für den Anteil an gebundenen fluoreszenzmarkierten Viren stand, konnte gezeigt werden, dass 5 μg filamentöse Viren (untere Bande) weniger Viruspartikel enthielten. Die beiden anderen Fraktionen hingegen enthielten mehr Viren und konnten daher mehr Zellen binden.

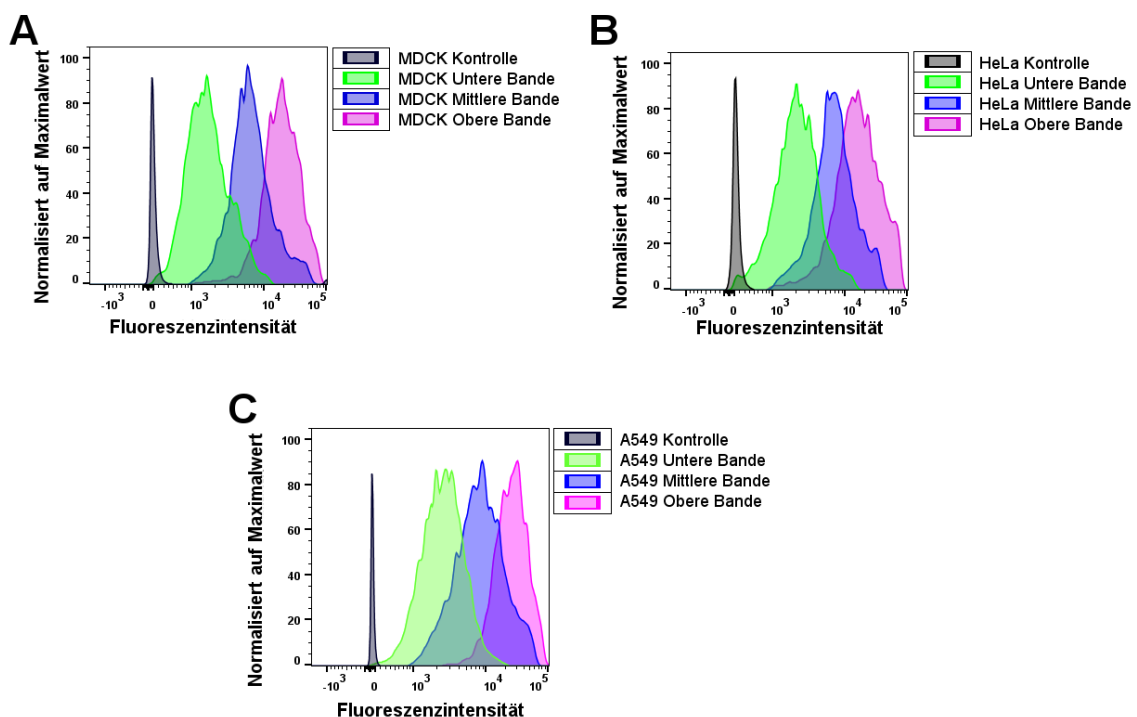


Abbildung 36: Zellbindung unterschiedlicher A/Panama (H3N2) Fraktionen aus einem Dichtegradient. Ermittlung der Bindung verschiedener R18-markierter A/Panama (H3N2) Fraktionen aus einem Saccharosegradienten an A) MDCK-II-Zellen, B) HeLa-Zellen und C) A549-Zellen. Aus Messungen mit DPBS behandelte Zellen ohne Viren konnte das Hintergrundsignal bestimmt werden.

Da filamentöse Viren gegenüber SA-tragenden Zellen eine höhere Affinität (höherer HA-Titer) aufweisen als sphärische Viren, wurde dieser Aspekt weiter gegenüber Oberflächen mit dem Peptid PeB und dem Aptamer A22 untersucht. Aus SPR-Messungen mit PeB oder A22 be-

schichteten Oberflächen konnte gezeigt werden, dass filamentöse Viren geringere Dissoziationskonstanten bei der Interaktion mit den beiden multivalenten Oberflächen aufweisen als sphärische Viren (Tabelle 29). Folglich ist das affinere Bindungsverhalten von filamentösen Viren gegenüber multivalenten Oberflächen nicht auf SA-präsentierenden Oberflächen beschränkt, sondern kann auch durch eine Darstellung von anderen HA-bindenden Rezeptoren ermöglicht werden.

Tabelle 29: Dissoziationskonstanten aus Messungen von sphärischen und filamentösen A/Panama (H3N2) Viren gegenüber verschieden beschichteten Oberflächen.

Beschichtung	$k_{\text{off}} [1/\text{s}]$	
	A/Panama (H3N2)	A/Panama (H3N2)
	sphärisch	filamentös
PeB	$1,08 \cdot 10^{-4}$	$7,83 \cdot 10^{-5}$
DNA	$8,61 \cdot 10^{-4}$	$2,41 \cdot 10^{-4}$

Zusammenfassend wurde in diesem Abschnitt gezeigt, dass filamentöse Viren aufgrund ihrer Morphologie ein höheres Bindungspotential gegenüber multivalenten Oberflächen aufweisen als sphärische Viren. Anhand von Bindungsstudien mit drei verschiedenen Epithelzelllinien wurde keine Präferenz der verschiedenen Virusfraktionen bzw. -morphologien bei der Bindung unterschiedlicher Zelltypen gefunden.

5. Diskussion

Zu Beginn einer Infektion bindet das Influenzavirus an die Wirtszelle über eine multivalente Interaktion zwischen viralen HA und SA-Rezeptoren auf der Zellmembran, um sein Eindringen in die Zelle zu ermöglichen. Die Blockierung dieser Interaktion durch HA-bindende Strukturen ermöglicht eine Unterbindung der natürlichen Virus-Zellinteraktion unmittelbar zu Beginn des viralen Replikationszyklus. Hierbei erwies sich die Verwendung von multivalenten Bindungsinhibitoren als eine erfolgreiche antivirale Strategie. Für die Entwicklung von hochaffinen Virusbindern war es jedoch notwendig, die verschiedenen Faktoren der Struktur und Organisation multivalenter Inhibitoren und ihre Bedeutung für die Wechselwirkung mit Viren zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Bestandteile eines multivalenten Bindungsinhibitors moduliert und deren Einfluss auf die virale Aktivität untersucht.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden monovalente HA-bindende Zucker, Peptide und Aptamere als Rezeptoren miteinander verglichen (Abschnitt 4.1) und im zweiten Abschnitt deren Bindungspotential bei einer multivalenten Präsentation gegenüber Viren studiert (Abschnitt 4.2). Unter den drei Rezeptorklassen erwiesen sich Antikörperpeptide und Aptamere als vielsprechende Bindungsinhibitoren.

Im dritten und vierten Teil dieser Arbeit (Abschnitt 4.3 und 4.4) wurden verschiedene statistische Rezeptor-Polyglycerolsysteme hinsichtlich ihrer antiviralen Eigenschaften untersucht, wobei Substanzen mit geeigneter Form, Flexibilität und Rezeptordichte identifiziert werden konnten. Anhand von Infektionsstudien mit Mäusen, für die die effizientesten Inhibitoren aus *in vitro* Messungen verwendet wurden, konnte gezeigt werden, dass sich flexible Gerüstsysteme besser für eine *in vivo* Anwendung als starre Multivalenzträger. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass sich die entwickelten Antikörperpeptide über eine multivalente Darstellung auf dendritischen Polyglycerolen als IAV-bindende Inhibitoren eignen und geringere Inhibitionswerte erzielen als die monovalenten Peptide.

Im fünften und sechsten Teil (Abschnitt 4.5 und 4.6) wurden starre Gerüstsysteme, wie PNA-DNA-Komplexe oder Q β -Phagenkapside untersucht, die es gestatten, optimale Rezeptorabstände für eine bivalente oder trivalente Interaktion mit HA bzw. Influenzaviren zu bestimmen. Über diese Herangehensweise konnten eindrucksvolle Multivalenzeffekte mit hohen Verstärkungsfaktoren erzielt werden. Anhand der Präsentation von optimalen bivalenten Rezeptorgruppen auf einzelsträngiger DNA konnte ein inhibitorischer Effekt des bivalenten Binders NA₅₉ gegen IAV weiter potenziert werden.

Im letzten Teil dieser Arbeit wurden sphärische und filamentöse A/Panama (H3N2) Viren in ihrem Bindungsverhalten gegenüber multivalenten Rezeptoroberflächen studiert. Dabei stellte sich heraus, dass filamentöse Virionen höher affine Wechselwirkungen mit planaren multivalenten Oberflächen eingehen als sphärische Viren.

Zusammenfassend ermöglichen diese Ergebnisse entscheidende Erkenntnisse für die zielgenaue Entwicklung hoch affiner multivalenter IAV-Binder als antivirale Substanzen. Im Folgenden werden die Ergebnisse aus den einzelnen Kapiteln, unter Berücksichtigung der im Abschnitt 2 formulierten Ziele, diskutiert.

5.1 Einschränkungen bei der Methodenwahl zur Ermittlung der Bindungsinhibition schwach affiner Binder

Die aus unterschiedlichen Bindungs- und Fusionsstudien ermittelten gemessenen Inhibitions- werte waren bis auf wenige Ausnahmen quantitativ konsistent (Tabelle 14 und 16). Beispiels- weise zeigten die gering affinen α -2,6-SL und α -2,6-SLN im HAI-Test mit humanen Erythrozy- ten weit höhere Inhibitionswerte (ca. 50 mM) als in SPR-Messungen (IC_{50} für α -2,6-SL = 0,9 mM). Whitesides und Mitarbeiter hingegen beschrieben einen KiHAI-Wert von 2,5 mM für SA bei der Verwendung von Hühnererythrozyten, die eine geringere Anzahl an α -2,6 verknüpf- ten Sialosiden aufweisen als humane Erythrozyten ([Mammen, Dahmann et al. 1995](#)). Eine Stu- die von Pritchett und Mitarbeitern zeigte auf, dass bei der Verwendung von humanen Erythro- zyten im HAI-Test eine Reduktion der α -2,6-Rezeptordichte durch enzymatischen Verdau not- wendig ist, um die Sensitivität gegenüber schwachen Bindern zu erhöhen ([Pritchett, Brossmer et al. 1987](#)). Bei Fusionsmessungen mit den antiviralen Peptiden zeigte sich für PeB und PeB^{GF} ebenfalls eine methodenabhängige Abweichung der Inhibitions- werte. Während bei den Fusi- onsmessungen millimolare Peptidkonzentrationen für eine halbmaximale Inhibition der maxi- malen Fusionseffizienz notwendig waren, wurden mit dem Hämolyseinhibitionstest mikromola- re Inhibitions- werte bestimmt. Die Werte aus den Hämolyseinhibitionsexperimenten waren de- nen aus den HAI-Versuchen zudem sehr ähnlich. Der Grund für die Diskrepanz in der Bestim- mung des Fusionsinhibitions- werts liegt hier an der Wahl der Methode und dem damit verbun- denen Versuchsablauf. Im Fusionsexperiment unterliegt die Inhibitor-Virus-Ghostmischung (40 μ l) bei der Überführung in das Messvolumen (2 ml) für die spektroskopische Analyse einem starken Verdünnungseffekt. Dadurch können bindende Moleküle dissoziieren und wieder eine virale Fusion erlauben. Typischerweise war der IC_{50} -Wert für die Fusionshemmung ca. 10 bis 20-fach schwächer als Inhibitions- werte aus HAI- oder Zellbindungsversuchen.

Um eine Aussage über den Verstärkungsfaktor eines multivalenten Binders gegenüber dem Referenzwert aus Messungen mit monovalenten Bindern ermitteln zu können, ist es daher wich-

tig, den Referenzwert vorzugsweise durch mehrere Methoden zu bestimmen. Dadurch kann vermieden werden, dass es zu einer Fehleinschätzung des Verstärkungsfaktors kommt.

5.2 Identifizierung alternativer HA-Rezeptoren

Im Vergleich zu SA als natürlichen IAV-Rezeptor erwiesen sich HA spezifische Peptide und Aptamere als attraktive Alternativen für eine Bindungshemmung von IAV. Bezüglich des antiviralen Potentials, das sich anhand von Bindungskompetitionsexperimenten auf die Blockierung der Virusbindung an die Zelloberfläche zurückführen ließ, konnten in der vorliegenden Arbeit mit den Peptiden PeB und PeB^{GF} mikromolare und mit den Aptameren A22 und P30-10-16 sogar nanomolare Bindungsinhibitionswerte gegenüber A/X31 (H3N2) erzielt werden (Tabelle 15). Darüber hinaus konnte auch eine Hämagglutinationsinhibition von A/Panama (H3N2) mit nanomolaren KiHAI-Werten für das Aptamer P30-10-16 und mikromolaren KiHAI-Werten für die Antikörperpeptide ermittelt werden. Anhand von Fusionsinhibitionsmessungen konnte weiterhin gezeigt werden, dass die beiden Aptamere und die aus dem Antikörper HC19 abgeleiteten Peptide PeB und PeB^{GF} auch in der Lage sind, die virale Fusionseffizienz mit Modellmembranen zu inhibieren. Diese Eigenschaft war unerwartet, da diese Binder gegen die HA1-Domäne entwickelt wurden, welche für die Bindung an SA-Rezeptoren dient. Einige aus der Literatur bekannte Fusionsinhibitoren gegen IAV interagieren mit der für die Fusion verantwortlichen HA2-Untereinheit und beeinträchtigen bzw. unterbinden die für die Fusion notwendige Konformationsumwandlung. Dieser Mechanismus ist aber für die hier untersuchten Antikörperpeptide und Aptamere auszuschließen, da zwar das Fusionsausmaß, jedoch nicht die Fusionskinetik beeinflusst wurde. Letzteres wäre im Falle einer Behinderung der die Fusion auslösenden Konformationsumwandlung zu erwarten, zumal mehrere HA-Trimere einen Fusionskomplex bilden. Folglich kann die Reduktion der Fusionseffizienz auf eine reduzierte Bindung von Viren an Zellmembranen zurückgeführt werden.

Für die Peptide L-P1, P1, S2 (1-8) und S2 (1-15) hingegen wurden sehr schwache, im Millimolarbereich liegende KiHAI- und IC₅₀-Werte aus SPR-Messungen mit A/X31 (H3N2) bestimmt. Für das Sialomimetikum S2 waren solche Werte zu erwarten, da bei dessen Selektionsverfahren ein Binder ausgewählt wurde, der in seinen Bindungseigenschaften dem natürlichen SA-Rezeptor ähnlich ist. „Docking“-Studien mit dem S2-Peptid an HA belegten auch eine Bindung innerhalb der Rezeptorbindetasche ([Matsubara, Onishi *et al.* 2010](#)). Mit dem Ziel einer multivalenten Peptidpräsentation und somit verbesserten Bindungsinhibitionswerten fügte die Gruppe um Matsubara an den N-Terminus der Peptidsequenz eine Acylgruppe an, um mizellare, selbstassemblierende Strukturen zu erhalten. In einer nachfolgenden Studie von uns an dem acylierten PeB^{GF} Peptid konnte anhand von elektronenmikroskopischen Untersuchungen gezeigt werden, dass die assemblierte Struktur aus diesen amphiphilen Molekülen inhomogen und dif-

fus erscheint ([Lauster, Pawolski et al. 2015](#)). Zudem konnte gezeigt werden, dass es in Gegenwart von Biomembranen zu einem Zerfall solcher nicht kovalenten Multivalenzsysteme kommen kann, da sich Bestandteile in Lipidmembran einlagern können. Von einer *in vivo* Anwendung von acylierten S2-Peptiden ist daher abzusehen.

Die schwache Bindungsinhibition von A/X31 (H3N2) mit den Peptide L-P1 und P1 lässt sich auf die stringende Selektion gegenüber spezifischer HA-Epitope von H9 bzw. H5 zurückführen. In der Tat ließen sich mit auf diese beiden Epitope selektierten Peptide nano- bis pikomolare Affinitätswerte erzielen ([Rajik, Omar et al. 2009](#), [Wu, Li et al. 2011](#)). Für bestimmte Zwecke, wie z.B. die Entwicklung von Bindern für diagnostische oder bildgebende Verfahren, sind solche Peptide vorteilhaft. Für eine breitwirksame Anwendung hingegen können sie keine oder eine nur eingeschränkte Verwendung finden.

Wählt man hingegen Epitope aus hochkonservierten HA-Region, können breitenwirksame Peptide gewonnen werden. Dies zeigte bspw. eine Studie von Lopez-Martinez und Mitarbeitern, in der Peptide über „Docking“-Studien gegen hochkonservierte Bereiche an der HA2-Stammregion entwickelt wurden. Für die Peptide C1LB-HA und C3LB-HA aus dieser Studie wurden ähnliche mikromolare Infektionsinhibitionswerte gegen H1N1- und H5N2-Varianten bestimmt gemessen ([Lopez-Martinez, Ramirez-Salinas et al. 2013](#)).

Dieses Beispiel illustriert, dass es möglich ist, über eine bioinformatische Methode antivirale Peptide zu entwickeln. Die Studie in der vorliegenden Arbeit mit dem Peptid PeB zeigte darüber hinaus, dass mit MD-Simulationen sogar verbesserte Peptide entwickelt werden können (Abschnitt 4.1.1). Vor allem im Hinblick auf eine zu erwartende natürliche Resistenzentwicklung ist die durch eine vergleichsweise einfache Synthese mögliche Adaptationsfähigkeit von Peptidzusammensetzungen eine vorteilhafte Eigenschaft, die bei der Entwicklung antiviraler Substanzen nützlich sein kann. Für Aptamere sind bioinformatische Methoden aufgrund der Strukturkomplexität erst in Zukunft zu erwarten.

Für HA-bindende Rezeptoren sind noch andere Aspekte zu beachten: Insbesondere stellen die Stabilität gegenüber enzymatischem Abbau, die Entstehung einer Immunreaktion, eine unspezifische Wechselwirkung mit Wirtsproteinen und der realisierbare Synthesemaßstab wichtige Kriterien bei der Wahl des Rezeptors dar. Dies soll nachfolgend kurz erläutert werden.

Da Sialoside, Peptide und Aptamere aus natürlich vorkommenden Biomolekülbausteinen bestehen, sind sie angreifbar gegenüber einem Verdau durch Wirtsenzyme. Abhängig von der Art des Biomoleküls gibt es jedoch eine Reihe von Möglichkeiten, um eine höhere Stabilität zu errei-

chen. O-glykosidische Bindungen von Sialosiden können gegen thioglykosidische Bindungen ausgetauscht werden. Peptide können über den Einbau von artifiziellen Aminosäuren (z.B. D-Aminosäuren) oder durch Zyklisierung der Peptidkette vor einem enzymatischen Abbau geschützt werden. Nukleinsäurebasierte Aptamere können über den Einbau von künstlichen Nukleotiden (z.B. Phosphorothioate oder 2'-O-Methylnukleotide) oder ebenfalls über eine Zyklisierung geschützt werden.

Bei der Verwendung von Biomolekülen als HA-Rezeptoren müssen weiter unerwünschte Wechselwirkungen mit Wirtsfaktoren berücksichtigt werden. Für Sialoside ist bspw. bekannt, dass sie mit Siglec-Proteinen auf Immunzellen wechselwirken und dadurch immunmodulatorische Effekte in Gang setzen ([Varki 2008](#)). Peptide weisen eine Antigenität auf, die beim Menschen individuell Anaphylaxien oder eine Entstehung von Resistenz verursachen können ([Van Regenmortel 2001](#)). Einzelsträngige Nukleinsäuren, aus denen Aptamere bestehen, können mit Toll-like-Rezeptoren (TLR7 und 9) interagieren und ebenfalls eine Immunantwort auslösen. Um eine Immunreaktion durch therapeutische Peptide oder Aptamere als HA-Rezeptoren zu reduzieren oder ganz auszuschließen, besteht die Möglichkeit, die Biopolymersequenz zu adaptieren oder künstliche Polymerbausteine zu verwenden bzw. zu integrieren.

Zuletzt spielt auch der Synthesemaßstab und der Zugang zu effizienten Aufreinigungs- und Anreicherungsverfahren eine wesentliche Rolle bei der Rezeptorwahl. Die Synthese von Zuckern und besonders von komplexen verzweigten Zuckerstrukturen ist aufwendig und bisher nur im geringen Maßstab realisierbar. Peptide und Aptamere hingegen können im industriellen Maßstab über Festphasensynthesen oder zellfreien Synthese- und Amplifikationsstrategien gewonnen werden. Für die Aufreinigung von Zuckern, Peptiden und Aptameren sind entsprechende Verfahren vorhanden, weswegen eine hohe Reinheit gewährleistet werden kann.

5.3 Aus Antikörpern abgeleitete Peptide gegen IAV

Im Gegensatz zu Aptameren und Zuckern bieten Peptide über den Austausch bestimmter Aminosäuren und modernen *in silico*- und Microarrayverfahren die Möglichkeit, ein vermindertes Bindungspotential gegenüber mutierten oder strukturdivergenten HA-Typen zu kompensieren oder sogar an Affinität gegenüber der ursprünglichen Zielstruktur hinzugewinnen. Letzteres belegt auch die Entwicklung der Doppelmutante PeB^{GF}, die aus dem Wildtyp-Peptid PeB des HA-bindenden Antikörpers HC19, der aus der gegenwärtigen Studie hervorging (4.1.1). Aufgrund der Tatsache, dass sich der PeB-Abschnitt des Antikörpers am Rand der SA-Bindetasche befindet, welcher eine konservierte HA-Region innerhalb einiger IAV-Vertreter darstellt ([Memczak, Lauster et al. 2016](#)), konnte ein breitenwirksames Potential löslicher Formen von PeB und PeB^{GF} gegenüber dem humanpathogenen IAV-Stamm A/Panama (H3N2) und dem

aviärpathogenen Stamm A/mute swan/Rostock (H7N1) gezeigt werden. Ob PeB und PeB^{GF} tatsächlich an der potentiellen Bindestelle des HC19 Antikörpers an HA bindet, gilt es weiter zu klären. Anhand von MD-Simulationen konnte zwar eine Interaktion mit der potentiellen Bindungsregion von PeB bzw. PeB^{GF} gezeigt werden, jedoch sind weitere experimentelle Studien zur Validierung dieser *in silico* Messungen erforderlich. Die Verwendung von molekularen Werkzeugen, wie dem PNA-DNA-Konstrukt, für eine starre bivalente Rezeptorseparierung erwies sich hierbei als sehr erfolgreich. Unter mehreren getesteten Rezeptorabständen war nur für 59 Å zwischen zwei PeB-Peptiden ein bivalenter Verstärkungseffekt in MST-Messungen nachweisbar. Dieser Abstand kommt der Distanz von 53,5 Å, welche für die direkte Verbrückung der antikörperbindenden Regionen innerhalb von HA-Trimeren notwendig ist, sehr nahe (Abbildung 11). Mit der Identifizierung der Rezeptorbindestelle würde auch die Entwicklung hoch affiner multivalenter Binder vorangetrieben werden.

Die Bindung an konservierte bzw. essentielle HA-Epitope ermöglicht demzufolge eine vielversprechende Alternative gegenüber einer randomisierten Selektion von Peptidbindern. Binder gegenüber der HA2-Domäne erwiesen sich hierbei als attraktive antivirale Zielstruktur für eine breitwirksame Neutralisierung von IAV. Dies belegen auch Studien an breitneutralisierenden IAV-Antikörpern, die teilweise sogar mit bis zu 16 HA-Typen interagieren konnten ([Corti, Cameroni et al. 2017](#)). Jedoch ist hier zu bemerken, dass es keine absolute Garantie für den Ausschluss einer Resistenzentwicklung an der essentiellen HA2-Domäne gibt, wodurch solche breitenwirksamen Antikörper ihr Bindungspotential verlieren können. So wurden bspw. auch HA-Mutanten an der Bindestelle von HC19 beschrieben ([Fleury, Wharton et al. 1998](#)).

Erst kürzlich wurde eine Arbeit veröffentlicht, in der auf Basis von Dockingstudien Aminosäuren der Paratopregion eines HA2-Domänen bindenden Antikörpers zusammengesetzt und zyklisiert wurden, um antivirale Peptide zu generieren ([Waldmann, Jirmann et al. 2014](#)). Dieser Ansatz ähnelt unserer Herangehensweise, bei der ganze Antikörperpeptide in linearer Form verwendet wurden.

5.4 Wirkmechanismen der Peptide Mucroporin-M1 und EB

Unter den untersuchten Peptiden befanden sich auch Kandidaten, die IAV über einen anderen Mechanismus als den der Bindungsinhibition hemmen. Das Peptid Mucroporin-M1 bspw. konnte in keinem Bindungsinhibitionstest studiert werden, da es hämolytisch wirkte und bei SPR-Messungen die Goldchipoberfläche irreversibel schädigte. Diese Effekte lassen sich anhand der folgenden Gründe erklären:

Das Peptid wurde ursprünglich aus einem Skorpionsgift abgeleitet, das *per se* starke Nekrosen und Hämolysen verursacht. Darüber hinaus weist das Peptid eine strukturelle Analogie zu anderen kationischen antimikrobiellen Peptiden (AMP) auf. Solche Peptide sind dafür bekannt, stark mit Lipidmembranen zu interagieren, wodurch es zu einer Beeinträchtigung der Membranintegrität kommen kann. Auch der Umstand, dass Mucroporin-M1 eine breite viruzide und mikrobizide Wirksamkeit gegenüber SARS-CoV, IAV H5N1, Edmonston MeV und einiger Staphylococcus-Varianten ([Dai, Ma et al. 2008](#)) aufweist, untermauert die Vermutung einer unspezifischen Interaktion mit Biomembranen. In SPR-Messungen scheint das Peptid das immobilisierte Neutravidin zu denaturieren, wodurch die nichtkovalent gebundenen, biotinylierten Rezeptoren von Neutravidin abgelöst werden. Trotz des hohen und breitwirksamen antimikrobiellen Potentials von Mucroporin-M1 ist eine therapeutische Anwendung aufgrund mikromolarer Toxizitätswerte unwahrscheinlich ([Dai, Ma et al. 2008](#)). Da es bisher an Hinweisen zu einer Interaktion von Mucroporin-M1 mit HA mangelt, kann von einer multivalenten Präsentation von Mucroporin-M1 abgesehen werden. Ähnlich verhält es sich mit dem EB-Peptid. Auch dieses Peptid erwies sich als eine breitenwirksame antivirale Substanz gegenüber diverser IAV-Stämme und DNA-Viren, wie Pockenviren, Herpesviren und Vacciniaviren ([Jones, Turpin et al. 2006](#), [Altmann, Jones et al. 2009](#), [Altmann, Brandt et al. 2012](#)). Da dieses Peptid eine Primärsequenz mit amphiphilem Charakter (kationischer N-Terminus mit unpolarem C-terminalen Anteil) aufweist, ist davon auszugehen, dass das Peptid multivalente Strukturen ausbildet. Dieser Umstand ermöglicht keinen Vergleich mit den anderen untersuchten monovalenten Rezeptoren. Eine Bildung von supramolekularen oder mizellaren Strukturen belegte auch das Interaktionsverhalten von EB mit dem Sensorchip im Zuge von SPR-Messungen (Abbildung 14). Da EB ab einer kritischen Konzentration (ca. $0,1 \mu\text{M}$) abrupt ein stark vermindertes SPR-Signal aufwies, ist davon auszugehen, dass EB bei höheren Konzentrationen multivalente Strukturen ausbilden kann. Zudem liegt dieser Wert auch sehr nahe dem nichtreferenzierten Inhibitionswert (ca. $0,08 \mu\text{M}$) gegenüber A/X31 (H3N2) und dem KiHAI-Wert (ca. $1,6 \mu\text{M}$) aus dem HAI-Test. Der antivirale Mechanismus von EB konnte bislang auf die Aggregation von Viren durch eine multivalente Interaktion von oligomerisierten EB-Peptidmonomeren mit viralen Glykoproteinen identifiziert werden ([Jones, Settles et al. 2011](#)). Ob die antivirale Aktivität über eine kovalente Präsentation von EB auf Trägersystemen erhalten bleibt oder eventuell verstärkt werden kann, sind interessante und lohnenswerte Fragestellungen, die in weiterführenden Studien hoch effektive Inhibitoren hervorbringen könnten.

5.5 Eignung alternativer HA-Binder für eine multivalente Interaktion mit IAV

Insgesamt sind die Dissoziationsraten für Protein-Rezeptorinteraktionen sehr gering (typischerweise 10^{-1} bis $10^{-6}/\text{s}$). Für HA-Rosetten aus X31 an Fetuin ($2 \cdot 10^{-4}/\text{s}$) und A/X31 (H3N2) Viren gegenüber α -2,6-SL haltigen Ceramiden ($0,9 \cdot 10^{-4}/\text{s}$) wurden ähnliche Dissoziationsraten mittels

SPR bestimmt ([Takemoto, Skehel et al. 1996](#), [Hidari, Shimada et al. 2007](#)). Für monovalente HA-SA-Interaktionen sind bisher keine kinetischen Parameter bestimmt worden, jedoch zeigten Interaktionsstudien von A/X31 (H3N2) Viren an verschiedene Zelllinien mittels AFM-Messungen Werte für k_{off} zwischen 0,18 und 0,64/s ([Sieben, Kappel et al. 2012](#)). Aufgrund der kurzen Adhäsionszeit und einer typischen einphasigen Abrisskurve ging man in dieser Studie von einer monovalenten Interaktion aus. Schnelle Dissoziations- und Assoziationsraten sind jedoch typisch für Kohlenhydrat-Lektininteraktionen ($k_{\text{on}}=10^{4-6} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; $k_{\text{off}}=10^{0-2} \text{ s}^{-1}$) ([Toshihiko 2012](#)). Die Stabilität des Rezeptor-Ligandenkomplexes nimmt demzufolge mit höher affinen Rezeptoren auch bei einer multivalenten Präsentation zu.

Aus SPR-Messungen mit Viren an multivalenten Oberflächen, die als Rezeptoren das Antikörperpeptid PeB oder das DNA-Aptamer A22 tragen, konnten geringere Dissoziationsraten ermittelt werden als mit multivalenten SL-Oberflächen. Hierbei ließ sich eine Korrelation zwischen der Affinität für den monovalenten Rezeptor und der Dissoziationsrate bestimmen. Höher affine Rezeptoren führten zu geringeren Dissoziationsraten. Da die Assoziationsraten bei diesen Messungen nicht ermittelt werden konnten, kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob durch eine multivalente Interaktion von Viren mit Aptamer oder Peptid beschichteten Oberflächen zu höheren Affinitäten führen. Anhand von Gleichung 1 wird jedoch ersichtlich, dass geringere Werte für die freie Bindungsenthalpie und damit geringere Dissoziationskonstanten für monovalente Rezeptoren mit höheren Bindungsenthalpien gewonnen werden können. Da das Aptamer A22 und das Peptid PeB gegen spezifische Virusepitope selektiert wurden und im Vergleich zu Versuchen mit SA geringere Bindungsinhibitionswerte gemessen werden konnten, kann von einer höheren Grundaffinität der beiden Rezeptoranalogen Strukturen ausgegangen werden. Bei gleicher Rezeptorvalenz eines multivalenten Binders sind mit höher affinen monovalenten Rezeptoren höhere Verstärkungsfaktoren zu erwarten als mit schwachen Bindern (siehe Gleichung 1).

5.6 Die Rolle der Größe und Morphologie von PGSA bei der Inhibition von IAV

Polyglycerole erwiesen sich in mehreren Studien als vorteilhafte Gerüstsysteme für eine multivalente Rezeptorpräsentation. Sie sind sehr gut wasserlöslich, formstabil und nicht toxisch. Polyglycerole können in dendritischer oder linearer Form und mit unterschiedlicher Größe oder Länge synthetisiert werden. Die chemische Struktur ermöglicht eine einfache Zugänglichkeit für Funktionalisierungen und die hohe Zahl an funktionalisierbaren Gruppen (Hydroxylgruppen) erlaubt das Einstellen eines gewünschten Funktionalisierungsgrades.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwei unterschiedlich große (10 und 500 kDa) dendritische Polyglycerolsialoside und ein lineares (10 kDa) Polyglycerolsialosid (PGSA) mit unterschiedlichen SA-Rezeptorvalenzen auf ihr inhibitorisches Potential gegenüber IAV untersucht.

In Bindungsexperimenten (HAI-, Einzelzellbindungstests) konnte gezeigt werden, dass charakteristische Rezeptorvalenzen bessere Inhibitionswerte erzielen. Für beide dendritischen PGSA-Serien erwies sich ein FG von 15-20 % als optimal für eine Bindungsinhibition von A/X31 (H3N2) an Erythrozyten. Für das lineare PGSA wurde ein FG von 45-70 % als Optimum identifiziert. Die daraus berechneten Rezeptordichten für die optimalen dendritischen und linearen PGSA-Binder liegen im Bereich der SA-Dichte von Säugerzellen, weswegen diese Binder als biomimetische Strukturen angesehen werden können.

Neben dem FG hat auch die Größe der Inhibitorstruktur eine Bedeutung bei der Hemmung der Virusbindung. Der Binder dPG **3b** hat einen hydrodynamischen Durchmesser (D_H) von 14,2 nm und zeigte das höchste Inhibitionspotential. Dass die Polymergröße einen Einfluss auf die Bindungsinhibition von IAV hat, zeigt sich auch im Vergleich zu einer zurückliegenden Arbeit der Gruppe um Papp ([Papp, Sieben et al. 2011](#)). In dieser Arbeit wurden kleinere Polyglycerolnanopartikel (3-5 nm) mit großen PG-Nanogelen (ca. 50 oder 70 nm) verglichen, wobei sich Nanopartikel mit einem Durchmesser von 50 nm und einer geringen SA-Dichte als die besseren Inhibitoren herausstellten. Insgesamt konnten dabei moderate mikromolare IC_{50} -Werte im Bezug zur SA Konzentration für das 50 nm Nanogel in Einzelzellbindungsversuchen gemessen werden. Für die kleinen Binder hingegen waren sogar millimolare SA-Konzentrationen für eine halbmaximale Inhibition erforderlich. Im Vergleich dazu konnten mit den effizientesten dendritischen IAV-Inhibitoren mit Polymerdurchmessern von 7 nm (dPG **2b**) und 14 nm (dPG **3b**) geringere IC_{50} -Werte bestimmt werden. Bei diesem Vergleich ist jedoch zu beachten, dass in der Arbeit von Papp und Kollegen ein zusätzlicher Propargyletherlinker für die Konjugation von SA an die Polyglycerole verwendet wurde. Demzufolge besitzen die PGSA-Binder von Papp eine höhere Flexibilität als diejenigen aus der gegenwärtigen Arbeit. Dass eine starre Rezeptorpräsentation bei geeigneter Rezeptordichte zu verbesserten Inhibitionswerten führt, zeigt auch der folgende Abschnitt mit den bivalenten PNA-DNA und den multivalenten Phagenkapsidgerüsten (Abschnitt 5.9 und 5.10).

Vonnemann und Mitarbeitern untersuchten den Aspekt der Inhibitorgröße anhand eines mathematischen Modells, dass darauf abzielte eine optimale Inhibitorgröße mit dem größtmöglichen Abschirmungseffekt zu erlangen ([Vonnemann, Liese et al. 2015](#)). Für eine sphärische Zielstruktur mit einem Durchmesser von 100 nm, welches ungefähr der Größe eines Influenzavirus entspricht, erwiesen sich Inhibitoren, die etwa ein Drittel der Zielstrukturgröße besitzen als am besten geeignet. Folglich könnten die hier untersuchten PGSA-Binder bei einer starren Rezeptorpräsentation auf ca. 30 nm großen Polyglycerolen eventuell zu noch besseren Inhibitionseffekten führen.

Als Ursache für die unterschiedlichen Inhibitionswerte aus den Bindungskompetitionsexperimenten kommen zwei wesentliche Eigenschaften von multivalenten Bindern zum Tragen: Die Avidität und die sterische Abschirmung. Die Avidität setzt sich aus der Affinität des monovalenten Rezeptors, der Anzahl an formierten Rezeptoren-Ligandenpaaren und der Rezeptorbeweglichkeit bzw. dessen Freiheitsgrade für die Entropie zusammen (siehe Abschnitt 1.3.1, Gleichung 2). Das Gerüst kann darüber hinaus die Zugänglichkeit eines Liganden blockieren (sterische Abschirmung) und somit einen weiteren Beitrag zur Inhibition der Bindung liefern ([Vonnemann, Liese et al. 2015](#)). Um den dominierenden Inhibitionscharakter der unterschiedlichen Polyglycerolarchitekturen zu untersuchen, wurde deshalb eine direkte Affinitätsmessung mittels mikroskaliger Thermophorese durchgeführt. Dabei zeigte der größere dPGSA-Binder die höchste Affinität, während für die kleineren und dendritischen PGSA geringere Werte bestimmte wurden. Daraus kann abgeleitet werden, dass das Bindungsinhibitionspotential der dendritischen PGSA vielmehr auf der Avidität beruht, während für lineare PGSA der sterische Charakter des Trägergerüsts entscheidend für die Inhibition ist. Das lineare PGSA faltet sich in wässriger Lösung in eine globuläre Struktur, wie Kryo-TEM-Aufnahmen belegen ([Bhatia, Lauster et al. 2017](#)). Ob diese Gestalt bei der Bindung an Viren erhalten bleibt oder ob es zu einer Polymerentfaltung kommt, wird im folgenden Abschnitt genauer betrachtet.

Anhand der MST-Messungen konnte auch eine weitere interessante Beobachtung gemacht werden: Für die dendritischen Polyglycerole konnte eine zweiphasige Bindung gefunden werden. Typischerweise deutet ein solches Bindungsprofil an eine Bindung an verschiedene Zielstrukturen hin, die den gleichen Rezeptor binden. Da neben HA auch NA mit SA interagiert, könnte die eine der beiden Bindungskurven für eine Bindung der PGSA-Binder an NA sprechen. Da NA im Vergleich zu HA eine höhere Affinität zu SA aufweist, könnte die kleinere Dissoziationskonstante für die Bindung von PGSA an NA stehen. Dem entgegen steht die Beobachtung, dass die Inhibitionswerte aus HAI-Versuchen für die dendritischen PGSA den Affinitätswerten sehr nahe kommen und eine Inhibition von NA zumindest für das X31 Virus zu keiner HAI führen dürfte. Welche der beiden Bindungskurven die Affinität gegenüber NA repräsentiert, müsste jedoch in weiteren Versuchen mit Neuraminidaseinhibitoren untersucht werden.

In Infektionsinhibitionsexperimenten erwiesen sich interessanterweise die linearen PGSA als effizienter im Vergleich zu dendritischen Bindern. Als Ursache könnte die Interaktion der Binder mit Zellen in Betracht gezogen werden. Die immunmodulatorischen Siglec-Rezeptoren binden ebenfalls an SA haltige Biomoleküle, wodurch die effektive PGSA Konzentration herabgesetzt werden kann ([Crocker, Paulson et al. 2007](#)). Ob jedoch die untersuchten PGSA mit Siglec-Rezeptoren interagieren, muss in weiteren Untersuchungen gezeigt werden. In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass Nanopartikel je nach Größe und Morphologie unterschied-

lich effizient endozytiert werden. Folglich könnten dendritische Binder zu einem größeren Anteil endozytiert werden als lineare Binder, womit ebenfalls die zur Verfügung stehende Inhibitorkonzentration reduziert werden würde. Um diesen Punkt abschließend klären zu können, müssten bspw. Endozytosestudien mit fluoreszenzmarkierten dendritischen und linearen Polyglycerolen durchgeführt werden.

Im Vergleich zu ähnlichen Polymersystemen auf Basis sphärischer PAMAM-Gerüste konnten weitere Erkenntnisse gewonnen werden. Die Forschergruppe um Kwon verwendete solche Gerüste für eine multivalente Präsentation von α -2,6-SL, womit verschiedene Influenzastämme inhibiert werden konnten. Durch die Verwendung dieses Trisaccharids war es folglich möglich, auch H1N1-Stämme zu adressieren, was mit den PGSA-Bindern nicht erreicht werden konnte. Bei der Anwendung im Tiermodell waren jedoch im Vergleich zu dem linearen Binder LPG **1b** höhere Mengen für eine Inhibition von H1N1 IAV-Stämmen erforderlich ([Kwon, Na et al. 2016](#)).

In der vorliegenden Arbeit wurde im Tiermodell auch eine kombinierte Verabreichung des linearen PGSA mit dem Neuraminidaseinhibitor Oseltamivircarboxylat getestet. Dadurch konnten eine vollständige Protektion von Mäusen vor einer IAV-Infektion erreicht werden. Whitesides und Mitarbeiter zeigten anhand einer Studie mit Polyacrylamid-SA-Konjugaten, dass durch die Besetzung von NA durch Neuraminidaseinhibitoren sich Polymerschleifen distal von der Virusoberfläche bilden können, die zu einer erhöhten sterischen Abschirmung führen können ([Choi, Mammen et al. 1996](#)). Inwiefern dies auch für die kürzen 10 kDa LPGSA zutrifft ist noch zu klären, jedoch besitzen die linearen Polymer im Gegensatz zu den sphärischen dPGSA prinzipiell die Fähigkeit einer strukturellen Anpassung an die Virusoberfläche nach Besetzung der SA-Bindestellen von NA. Unabhängig von dieser mechanistischen Fragestellung hat eine kombinierte Gabe von NA und HA Inhibitoren den entscheidenden Vorteil, dass eine Entwicklung von Resistenzen durch Mutation der Viren stark herabgesetzt werden kann. Dies zeigte sich bspw. anhand der gegen HIV erfolgreich durchgeführten hochaktiven antiretroviralen Therapie (HAART), bei der zur gleichen Zeit drei Wirkstoffe, die verschiedene Virusstrukturen adressieren, verabreicht wurden ([Granich, Crowley et al. 2010](#)).

Bei Influenzaviren kann es durch eine Langzeittherapie mit multivalenten Sialosiden zu einer Mutation der Rezeptorbindetasche oder zu einer Blockierung der Zugänglichkeit der Rezeptorbindetasche durch Glykosylierungen in der näheren Umgebung kommen. Eine Untersuchung der Häufigkeit und Position der Glykosylierungsstellen an HA von IAV-Stämmen, die über einen längeren Zeitraum aus Menschen isoliert wurden, stellte sich heraus, dass zeitlich jüngere IAV-Stämme eine höhere Anzahl an Glykosylierungen tragen, was auf einen natürlichen Evolu-

tionsprozess der Viren bei der Anpassung an den menschlichen Wirt schließen lässt ([Tate, Job *et al.* 2014](#)).

5.7 Betrachtung des Bindungsmodus von linearen Polyglycerolsialosiden

Wie sich anhand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen erkennen ließ, nehmen lineare PG bevorzugt eine runde Form an ([Bhatia, Lauster *et al.* 2017](#)). Dieses Faltungsverhalten könnte aus entropischen Gründen (hydrophober Effekt) von statten gehen. Ob sie ihre Form auch nach Bindung an die Virusmembran behalten, konnte aufgrund mangelnder Kontrastierung nicht dargestellt werden. Energetisch betrachtet müsste die Bindungsenthalpie die Entfaltungsentropie unter physiologischen Bedingungen dominieren, um der Gesamtenthalpie für die Bindung der Polymere an die Viren einen exergonen Charakter zu bieten. Um dies abschließend klären zu können, bedarf es jedoch weiteren Untersuchungen mit weiteren strukturbasierten Verfahren und unter optimierten Kontrastierungsmethoden, um die Bindungskonfiguration der linearen Polymere am Hämagglutinin aufklären zu können.

Mithilfe einer vereinfachten thermodynamischen Betrachtung kann jedoch Anhand der experimentellen Daten abgeschätzt werden, ob es zu einer Änderung des Polymerradius durch die Bindung kommen kann und zu welchem Anteil ein Multivalenzeffekt eintritt. Möchte man zunächst den letzteren Punkt adressieren, genügt es zur Vereinfachung sich auf die Summe der Bindungsenthalpiebeiträge zu beschränken. Sieben und Mitarbeiter berechneten anhand von MD-Simulationen einen Energiewert unter Standardbedingungen von 20 k_BT für die Bindung einer Sialinsäure an HA ([Sieben, Kappel *et al.* 2012](#)). Unter Vernachlässigung thermodynamischer Energiebeiträge des PG-Gerüst, lässt sich im Falle des multivalenten Binders LPG₁₀SA_{0.40} **1b** mit 60 Sialinsäuren ein maximal möglicher Energiewert von 1200 k_BT berechnen.

Aus der experimentell bestimmten Dissoziationskonstante für LPG **1b** K_D (10,1 μM) lässt sich über die folgende Beziehung die Bindungsenergie abschätzen ([Woo and Roux 2005](#)):

$$(16) \quad \Delta F_{bind} = -k_B T * N_A * \ln(K_D V_{BS})$$

Mit k_BT als Boltzmannkonstante (1 k_BT * N_A = 2,451 kJ/mol), N_A als Avogadrozahl, T als absolute Temperatur T während den Messungen (T = 22°C = 295,15 K) und V_{BS} als Volumen der Bindetasche. Für V_{BS} wurde ein Kugelradius von 2 Å angenommen, woraus sich ein Volumen von 0,0042 nm³ berechnen lässt. Durch einsetzen der bekannter Parameter lässt sich somit ein Energiewert der Bindung berechnen: ΔF_{bind} = - 17,5 k_BT bzw. - 42,9 kJ/mol. Da sich diese Beziehung im Vergleich zu der Summe der maximal möglichen Enthalpiebeiträge (1200 k_BT) streng genommen auf den entropischen Beitrag des Faltungsprozesses bei der Bindung bezieht,

können die Werte nicht miteinander verglichen werden. Über die Bindungsenergie lässt sich jedoch die Änderung des Nanopartikelradius wie folgt berechnen:

Für eine ideale Polymerkette kann die Änderung der freien Energie ($\Delta F_{\text{Gauß}}$) bei Verschiebung der Abstände der Polymerkettenenden über folgende Beziehung beschrieben werden ([Gennes 1993](#)):

$$(17) \quad \Delta F_{\text{Gauß}}(\Delta r) = \frac{3}{2} k_B T \left(\frac{R_0 + \Delta r}{R_0} \right)^2 - \frac{3}{2} k_B T \left(\frac{R_0}{R_0} \right)^2$$

Bei dieser Formel steht Δr für die Änderung der tatsächlich vorliegenden Änderung der Abstände der Polymerkettenenden und R_0 für den mittleren Abstand der Polymerkettenenden. R_0 kann näherungsweise über den hydrodynamischen Radius ($R_{H, \text{LPG 1b}} = 5,145 \text{ nm}$) und dem Proportionalitätsfaktor von 0,271 über folgende Beziehung bestimmt werden ([Teraoka 2002](#)):

$$(18) \quad R_0 \approx \frac{R_H}{0,271} = 18,99 \text{ nm}$$

Durch gleichsetzen von Gleichung 16 und 17 und unter Einbezug von R_0 folgt:

$$(19) \quad \Delta r = R_0 \left(\sqrt{\frac{2}{3} \frac{\Delta F_{\text{bind}}}{k_B T} + 1} - 1 \right) = 48,60 \text{ nm}$$

Daraus folgt, dass es bei der Bindung von LPG **1b** an die Virusoberfläche zu einer Polymerentfaltung kommen kann. Aus der Änderung der Distanz der Polymerkettenenden lässt sich weiter der Gyrationradius (R_G) wie folgt berechnen ([Teraoka 2002](#)):

$$(20) \quad R_G = \frac{R_0 + \Delta r}{\sqrt{6}} = 27,59 \text{ nm}$$

Das Polymer könnte mit diesem Radius eine Virusoberfläche von ca. 2.391 nm^2 bedecken, wohingegen das nichtgebundene Polymer nur eine Fläche von 83 nm^2 bei der Bindung einnehmen würde. Das gebundene LPG **1b** könnte folglich ca. 72 SLA-Bindetaschen (0,03 SLA-Bindetaschen pro nm^2 Virusoberfläche) bedecken, während das nichtentfaltete Polymer räumlich nur eine Fläche über 2,5 SLA-Bindetaschen einnehmen könnte. Diese Betrachtung ist jedoch stark vereinfacht, zumal die Polymergeometrie bei der Bindung an das Virus abflachen kann und nicht zwingend eine sphärische Struktur beibehalten muss.

Die Zunahme des Polymerradius könnte auch ein Hinweis auf den Inhibitionscharakter von LPG **1b** darstellen. Da die Affinitätswerte schwächer als die Inhibitionswerte (Abschnitt 4.3.1)

waren, könnte der ausgeprägte sterische Charakter des Polymers einen Beitrag bei der Bindungsinhibition liefern.

An dieser Stelle sind jedoch weitere strukturbasierte oder biophysikalische Untersuchungen notwendig, um die prognostizierte Größenänderung von $\text{LPG}_{10}\text{SA}_{0.40}$ **1b** aus der Berechnung validieren zu können.

5.8 Multivalente PG-Peptidkonjugate als attraktive Alternative zu multivalenten Sialosiden

Die Studie an den Antikörperpeptid-Polymerkonjugaten demonstrierte, dass IAV auch mit multivalenten peptidbeschichteten Nanopartikeln inhibiert werden können. Analog zu den Ergebnissen mit den dendritischen SA beschichteten Polyglycerolen erwiesen sich eine Rezeptordichte auf großen Polymeren im Vergleich zu höheren Rezeptordichten oder kleineren Polymeren als effizienter in der Hemmung von IAV. Mit dem besten Binder $\text{dPG}_{340}\text{PeB}_9$ **4b** konnten nanomolare Infektionsinhibitionswerte bestimmt werden, und im Tiermodell konnte ein vorübergehender (bis Tag 4 nach Infektion) antiviraler Effekt nachgewiesen werden. Strukturbasierte Untersuchungen und Affinitätsmessungen mit der mikroskaligen Thermophorese führten die Virusinhibition auf eine Bindung der Peptidnanopartikel an die Virusoberfläche zurück. Bei diesen Untersuchungen stellte sich außerdem heraus, dass eine multivalente Präsentation von der Peptiddoppelmutante PeB^{GF} im Vergleich zum Wildtyppeptid höhere Affinitätswerte gegen A/X31 (H3N2) erzielen konnte. Dieses Ergebnis entspricht auch dem theoretischen Multivalenzmodell (siehe Abschnitt 1.3.2), welches für multivalente Binder, die affinere monovalente Rezeptoren tragen, höhere Bindungswerte im Vergleich zu Bindern mit geringer affinen Rezeptoren, prognostiziert. In Anlehnung an die experimentellen Ergebnisse aus HAI-Messungen mit den PGSA sind die Verstärkungseffekte der multivalenten Peptid-Nanopartikel jedoch relativ gering. Dieser Umstand könnte der unspezifischen Wechselwirkung der peptidtragenden Inhibitoren mit Biomembranen geschuldet sein.

Da die PeB^{GF} funktionalisierten Nanopartikel in zellbasierten Experimenten ähnlich effektiv wie PeB beschichtete Nanopartikel waren und in Tierexperimenten keine antivirale Wirksamkeit des multivalenten Binders $\text{dPG}_{340}\text{PeB}^{\text{GF}}_{10}$ **4d** nachgewiesen werden konnte, ist eine Wechselwirkung mit Zellmembranen naheliegend. Ursache für die geringere Wirksamkeit von $\text{dPG}_{340}\text{PeB}^{\text{GF}}_{10}$ **4d** könnte der hydrophobe Charakter der Peptidsequenz sein, welcher zu einer verstärkten Interaktion mit Biomembranen führen kann. Neben diesem Nebeneffekt könnte aber auch eine spezifische Interaktion mit bisher unbekannten Zellrezeptoren stattfinden, welches zu einer Reduktion der wirksamen Inhibitorosis führen kann. Die Beobachtung, dass der Binder $\text{dPG}_{340}\text{PeB}_9$ **4b** im Tiermodell nur eine vorübergehende Wirksamkeit, wirft ebenfalls die Frage auf, durch welche Mechanismen der antivirale Effekt keine langanhaltende Wirkung wie bei

den PGSA-Inhibitoren zeigt. Eine Möglichkeit wäre eine Interaktion der Peptidnanopartikel mit Immunzellen, die ebenfalls zu einer Reduktion der zur Verfügung stehenden Inhibitorosis führen kann. Um den Wirkmechanismus der Peptid-Nanopartikel im Tiermodell aufklären zu können, sind histologische Untersuchungen der Lunge und Untersuchungen der Inhibitoren mit Immunzellen erforderlich. Die Reaktion von Immunzellen auf multivalente Binder ist auch im Hinblick der Entstehung einer Immunresistenz aufschlussreich, wenn die Inhibitoren bei einer wiederkehrenden Infektion durch IAV verabreicht werden sollen. Die Entwicklung einer adaptiven Immunantwort beansprucht in der Regel 2-3 Wochen, die eine kurzzeitige Behandlung einer akuten IAV-Infektion mit demselben Inhibitor ermöglichen würde. Um einen langanhaltenden antiviralen Effekt über den gesamten Beobachtungszeitraum von 11 Tagen zu gewährleisten, könnte eine zusätzliche Inhibitorgabe zielführend sein. Die Verwendung von Aerosolkammern könnte hierbei eine für die Tiere schonende Methode zu wiederholten Verabreichung der Nanopartikel sein und darüber hinaus als Modell für die Entwicklung von antiviralen Sprays dienen ([Gambaryan, Tuzikov et al. 2002](#)).

Kommt es jedoch zu einer Resistenzentwicklung, müssten die Peptid-PG-Konjugate mit veränderten Peptiden erstellt werden. Dasselbe wäre auch der Fall, wenn diese Inhibitoren zu einer Virusmutation führen, wodurch ebenfalls deren Wirksamkeit reduziert werden würde. Diesbezüglich haben Peptid-Nanopartikel im Vergleich zu PGSA einen entscheidenden Vorteil: Für PGSA ist aufgrund der Verwendung eines natürlichen Rezeptors keine Immunresistenz zu erwarten, jedoch könnten sie durch eine wiederholte Gabe zur Entstehung resistenter IAV-Mutanten führen. Die Peptide der Peptid-PG-Konjugate hingegen können durch eine Sequenzoptimierung an neue Virusmutanten angepasst werden. Darüber hinaus könnten auch andere HA-Epitope, wie bspw. an der hochkonservierten HA2-Domäne adressiert werden.

Ernüchternd ist jedoch der multivalente Verstärkungseffekt der Peptid-PG-Konjugate im Vergleich zu den monovalenten Peptiden aus HAI-Experimenten. Für die effektivsten Binder **4b** und **4d** konnten Verstärkungsfaktoren zu den monovalenten Peptiden PeB und PeB^{GF} von gerade einmal 3- bzw. 60-fach bestimmt werden. Bei Betrachtung von Gleichung 1 wären jedoch weit höhere Verstärkungsfaktoren zu erwarten gewesen. Mit den besten PGSA-Bindern hingegen konnte eine bis zu 17.000-fache Verstärkung bei der Hämagglutinationsinhibition im Vergleich zu dem monovalenten Trisaccharid α -2,6-SL (100 mM) bestimmt werden. Ein Grund für die geringeren Verstärkungsfaktoren der Peptid-PG-Konjugate könnte die Rezeptordichte sein, die eventuell noch nicht dem Optimum entspricht. In dieser Studie wurde lediglich eine Peptidfunktionalisierung der Polyglycerole von 10 oder 30 % getestet, was Peptiddichten zwischen 1-2 Peptiden pro nm² entspricht und damit im Bereich der Rezeptordichte von Säugerzellen liegt. Obwohl ähnliche Rezeptordichten für die PGSA-Binder bestimmt wurden, können für die Anti-

körperpeptide Rezeptordichten unterhalb von 10 % oder zwischen 10 und 30 % eventuell besser geeignet zu sein. Einen weiteren Grund könnte die Peptidstruktur darstellen. Diese unterliegt im Gegensatz zu den starren SA-Rezeptoren einer ständigen Struktur­dynamik, sodass Konformationen eingenommen werden können, die eine Interaktion mit HA behindern und zu einer sterischen Abstoßung des Gesamtpolymers von der Virusoberfläche führen können. Über eine Struktur­stabilisierung der Peptide durch Zyklisierung könnte dieser Punkt weiter untersucht werden und die eventuell die Effektivität von Peptid-PG-Konjugaten verbessert werden.

Zusammenfassend repräsentiert diese Studie das erste Beispiel für eine Gewinnung antiviraler Nanopartikel, die mit Antikörperpeptiden beschichtet wurden. Diese Herangehensweise könnte auch für andere Zielstrukturen eine attraktive Strategie für die Entwicklung multivalenter Bindungsinhibitoren darstellen.

5.9 Eignung von molekularen Werkzeugen zur Ermittlung einer optimalen, bivalenten Bindung an IAV

Alternativ zu dem Selektionsverfahren von optimalen Rezeptordichten aus einem Sortiment an statistischen Rezeptorpolymerkonjugaten konnten auch über einen strukturbasierten Ansatz affine Binder gegen Influenza HA entwickelt werden. Für die Bestimmung eines optimalen bivalenten Rezeptorabstands gegen HA-Trimere stellten sich im Rahmen der vorliegenden Studie starre PNA-DNA-Gerüste als geeignet heraus. In MST-Messungen konnte mit ihnen ein optimaler Abstand zweier α -2,6-SLN-Rezeptoren von 52 Å bei der Verbrückung der kanonischen Rezeptorbindetaschen eines HA-Trimers gemessen werden (Abbildung 28). Das experimentell bestimmte Abstandsoptimum ist etwas größer als der anhand der Kristallstruktur abgemessene Abstand (46 Å) der kanonischen Rezeptorbindetaschen. Bei der Ausmessung wurden jedoch topologische Unebenheiten, wie sie an der apikalen HA-Seite vorliegen, außer Acht gelassen. Anhand der Messergebnisse wird ersichtlich, dass zur Umgehung der sterischen Hindernisse an der HA-Oberseite ein Abstand von 52 Å notwendig ist. Die *nick sites* zwischen den PNA-Segmenten, mit denen die komplementäre DNA hybridisiert, ermöglicht auch eine leichte Krümmung des PNA-DNA-Komplexes, sodass solche strukturellen Unebenheiten überwunden werden können.

Im Gegensatz zu den MST-Messergebnissen erwies sich in HAI-Experimenten ein Rezeptorabstand von 59 Å (KiHAI = 44 µM) als geringfügig besser als ein Abstand von 52 Å (KiHAI = 63 µM). Diese Diskrepanz könnte dem Messprinzip des HAI-Tests geschuldet sein. Beim HAI-Test handelt es sich um einen Konkurrenzexperiment, bei dem die getesteten Inhibitoren um eine Virusbindung mit den SA-haltigen Biomembranen der Erythrozyten konkurrieren. Der Binder NA₅₉ könnte hierbei eine zusätzliche sterische Komponente bei der bivalenten Interakti-

on mit HA-Trimeren einbringen, wodurch geringere Inhibitionswerte erreicht werden können als die Affinitätsmessungen mit der MST vermuten lassen.

Zu einem ähnlichen Ergebnis kam auch die Gruppe um Glick mit bivalenten Sialosiden, die SA über Glycinlinker an einem Benzolring präsentieren ([Glick and Knowles 1991](#)). Anhand von HAI-Experimenten mit A/X31 (H3N2) erwies sich ein Rezeptorabstand von 57 Å als optimal für eine Interaktion mit HA-Trimeren. Da dieser Rezeptorabstand in NMR-Messungen gegen bHA aus demselben Virustyp nur geringfügig bessere Dissoziationskonstanten im Vergleich zu monovalentem SA hervorbrachte, stellte die Forschergruppe die Vermutung an, dass der 57 Å Binder eine intertrimerische Bindung, also eine Verbrückung von zwei HA-Trimeren eingeht. Dieser Hypothese kann durch unsere mathematischen Modellierung anhand folgender Punkte widersprochen werden: Zunächst einmal wurde von Glick und Mitarbeitern anhand der maximalen Länge von zwei Glycintetrameren an einem Benzolring im trockenen Zustand auf eine Länge von 57 Å geschlossen. Die flexible Peptidstruktur lässt jedoch eher auf kürzere Abstände vermuten, sodass eine intertrimerische Verbrückung (ca. 60 Å) nicht erreicht werden kann. Des Weiteren müssen für eine intertrimerische Bindung die HA-Trimere in starrer und gleichausgerichteter Orientierung vorliegen. Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Virusoberfläche zeigten jedoch, dass die HA-Trimere in ungeordneter Orientierung zueinander ausgerichtet sind ([Bandlow, Liese et al. 2017](#)). Darüber hinaus kann eine Rotation oder Translationsbewegung von HA-Trimeren in der Virusmembran zusätzlich die Wahrscheinlichkeit einer intertrimeren bivalenten Bindung verringern. Obwohl das Vorliegen einer Rotation von HA-Trimeren in der Virusmembran anhand von experimentellen Studien bei Raumtemperatur bislang als geringfügig eingestuft wurde, können, wie anhand des Sendaivirus gezeigt worden ist, Glykoproteine unter physiologischen Temperaturen (37°C) eine erhöhte Rotation aufweisen ([Lee, Cherry et al. 1983](#), [Junankar and Cherry 1986](#)). Eine computergestützte Studie zeigte außerdem, dass eine Translationsbewegung von HA in der Virusmembran stattfinden kann ([Reddy, Shorthouse et al. 2015](#)).

Unerwartet war das Ergebnis, dass auch ein Rezeptorabstand von 26 Å zu geringeren KiHAI-Werten führte als ein Rezeptorabstand von 23 oder 33 Å. Dies könnte anhand einer Verbrückung einer kanonischen SA-Bindestelle mit einer weiteren sekundären Bindestelle (Abbildung 28). Das Vorliegen einer sekundären Bindestelle wurde von Sauter und Kollegen anhand von NMR-Messungen mit bHA entdeckt ([Sauter, Glick et al. 1992](#)). Für diese Bindestelle konnten jedoch eher schwache Affinitätswerte und eine Rezeptorpräferenz für α -2,3-SL bestimmt werden. Anhand der Kristallstruktur ließ sich ein Abstand der SA-Bindetaschen bestimmen, der dem Abstand von 26 Å nahekommt. Das Vorliegen einer solchen Verbrückung wurde ebenfalls anhand von mathematischen Modellierungen untermauert ([Bandlow, Liese et al. 2017](#)). Im Ge-

gensatz zu den MST-Messungen konnten in HAI-Experimenten weit geringere KiHAI-Werte für den 26 Å Abstand bestimmt werden. Analog zu der Erklärung bezüglich des sterischen Charakters des 59 Å Binders, könnte auch hier das Gerüst eine Rolle bei dem Zugewinn in der Bindungsinhibition sein. Die Bindung an die sekundäre Bindestelle könnte auch eine sensible Region zu Bindungsinhibition von IAV sein: Diesbezüglich zeigten Peng und Mitarbeiter, dass verzweigte Zucker stärker mit Viren interagieren als lineare Sialoside ([Peng, de Vries et al. 2017](#)). Eine Interaktion solcher Zuckerseitenzweige mit sekundären Bindestellen könnte demzufolge in Betracht gezogen werden.

Um den Einfluss der Gerüstflexibilität bei der Bindung an HA-Trimere zu untersuchen, wurden im Rahmen der vorliegenden Studie die starren Nukleinsäuregerüste mit flexiblen Polyethylenglykolgerüsten (PEG) im Hinblick auf das Bindungspotential gegenüber IAV untersucht und verglichen. Aufgrund einer homogenen Ladungs- und Hydrophobizitätsverteilung über die gesamte HA-Oberfläche ist eine geringe Interaktion beider Gerüstsysteme mit HA nahe liegend ([Bandlow, Liese et al. 2017](#)). Dies belegen auch MST-Messungen beider Gerüstsysteme mit nur einem Rezeptor: Mit dem monovalenten PNA-DNA-Binder wurde nur eine zwei- bis dreifach höhere Affinität im Vergleich zu dem monovalenten unkonjugierten Rezeptor bestimmt. Für den monovalenten PEG-Binder wurde sogar eine ca. zweifach höhere Dissoziationskonstante im Vergleich zu α -2,6-SLN bei der Interaktion mit bHA bestimmt. Die geringere Affinität des PEG-Binders kann auf eine eingeschränkte Zugänglichkeit des Rezeptors bei der Bindung an HA zurückgeführt werden, da das PEG Gerüst eine geknäulte Form annehmen kann, wodurch es zu einer sterischen Abstoßung bei der Interaktion von PEG mit der HA-Oberfläche kommen kann. Diese sterische Abstoßung wird auch deutlich bei der Untersuchung der verschiedenen bivalenten PEG-Binder: Insgesamt konnten für die verschiedenen Rezeptorabstände (r_{ete} zwischen 29 und 79 Å) höhere Dissoziationskonstanten bei der Interaktion mit bHA gefunden werden. Außerdem zeigte sich anhand dieser Messungen keine prägnante Abstands-Affinitätsbeziehung, wie sie bei den Nukleinsäuregerüsten zu beobachten war. Vielmehr nahm die Affinität von kurzen zu langen Rezeptorabständen leicht um einen Faktor von zwei ab. Mit dem PNA-DNA-Binder NA₅₂ hingegen konnte eine Verstärkung um den Faktor 30 im Vergleich zu dem monovalenten Binder NA_m auf dem Nukleinsäuregerüst erzielt werden.

Durch den Vergleich von flexiblen und starren Gerüstsystemen für eine Rezeptorpräsentation wird deutlich, dass durch eine vordefinierte Rezeptorausrichtung höhere Verstärkungsfaktoren gewonnen werden können, jedoch müssen dafür die Rezeptorabstände an die strukturellen Gegebenheiten von HA angepasst werden. Wie sich anhand der Bindungsexperimente mit den Nukleinsäuregerüsten zeigt, führen unpassende Rezeptorabstände zu einer geringeren Affinität,

welche sich auf eine sterische Behinderung bzw. entropischen Bestrafung bei der Rezeptor-Ligandeninteraktion zurückführen lässt.

An dieser Stelle soll jedoch festgehalten werden, dass diese Studie nicht darauf abzielte, antivirale Binder zu generieren. Diese Arbeit diene in erster Linie der Bestimmung einer optimalen bivalenten Rezeptorgruppe, wobei sich die starren PNA-DNA-Heteroduplexe als nützlich erwiesen, da bereits kleine Änderungen bei den Rezeptorabständen zu deutlich erhöhten Inhibitions- und Bindungswerten durch eine sterische Abstoßung der Rezeptoren an der HA-Oberfläche führten. Die Studie an bivalenten PeB-Peptiden auf den Nukleinsäuregerüsten zeigte, dass sich diese Methode zur Epitopkartierung auch für andere Binder eignet. Für die bivalenten PeB-Binder konnte ein optimaler Abstand von 59 Å bestimmt werden. Der ca. dreifache Verstärkungseffekt in MST-Messungen war jedoch ernüchternd, was zum einen an dem gering affinen monovalenten PeB mit zwei Lysinresten am N-Terminus der Peptidsequenz und zum anderen anhand der Strukturdynamik des Peptids erklärt (siehe Abschnitt 5.3) werden könnte.

Mit den bivalenten Sialosiden konnte auch eine Serospezifität bestimmt werden: Der gegen A/X31 (H3N2) als optimal identifizierte Abstand von 59 Å war auch in der Lage A/Panama (H3N2) zu inhibieren. Gegen das H1N1 Virus A/Puerto Rico (H1N1) hingegen war keine Inhibition in HAI-Experimenten festzustellen. Bei Betrachtung der Abstände der SA-Bindetaschen an der Kristallstruktur konnte für HA aus diesem H1N1 Virus ein etwas größerer Abstand gemessen werden. Alternativ könnten Unterschiede in der HA-Glykosylierung in Betracht gezogen werden. Peng und Mitarbeiter zeigten jedoch erst kürzlich, dass HA-Glykosylierungen keinen Einfluss bei der Differenzierung verschiedener HA-Serotypen hat ([Peng, de Vries et al. 2017](#)).

Abzielend auf die Entwicklung von antiviralen Substanzen erwies sich die Strategie der Präsentation von 59 Å separierten Rezeptorgruppen auf PolyDNA als erfolgsversprechend. Mit solchen Bindern konnten subnanomolaren KiHAI-Wertes bestimmt werden, wohingegen bei der Verwendung von 42 Å Rezeptorclustern keine messbare Inhibition nachgewiesen werden konnte. Die Abstands-Affinitätsbeziehung bleibt folglich auch bei einer höhervalenten Rezeptorpräsentation konserviert. Eine unpassende Rezeptorseparierung könnte eventuell auch zu einer potenzierten entropischen Bestrafung bei Interaktion mit der Virusoberfläche führen.

Zur weiteren Optimierung von PolyDNA sollen in folgenden Studien DNA-Stränge mit Verzweigungen untersucht werden. Um eine Breitenwirksamkeit zu erlangen wäre außerdem die Frage der Gerüststruktur von Interesse.

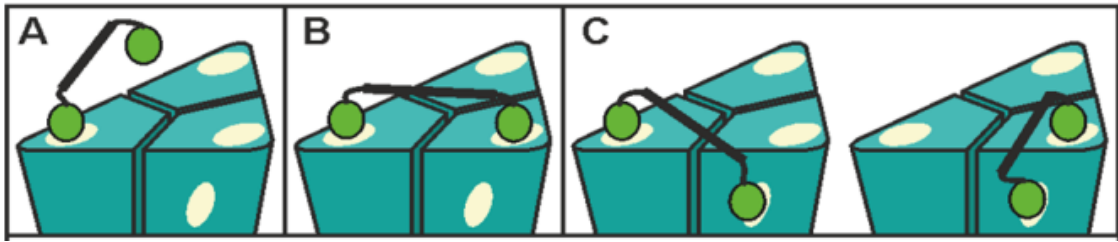


Abbildung 28: Schematische Darstellung der Interaktion zwischen einem bivalenten Binder und trimerem HA. A-C) Der bivalente Binder kann entweder A) monovalent B) mit zwei kanonischen Bindestellen interagieren oder C) mit einer kanonischen und einer sekundären Bindestelle interagieren. Die Abbildung wurde von der Kooperationspartnerin Dr. Susanne Liese (FU Berlin) erstellt und stammt aus einer gemeinsamen Publikation ([Bandlow, Liese et al. 2017](#)).

5.10 Das Q β -Phagenkapsidgerüst als IAV-Inhibitor und Modell für Multivalenzstudien

Mit den Phagenkapsidgerüsten konnte ein optimaler trivalenter Rezeptorabstand bestimmt werden. Q β -Phagenkapside, die SA über eine EG-Einheit präsentieren, konnten nanomolare KiHAI- und Affinitätswerte bestimmt werden. Unter mehreren trivalenten Rezeptorgruppierungen auf der Phagenkapsidoberfläche kommt ein Rezeptorabstand der Kantenlänge eines gleichseitigen Dreiecks von ca. 5,5 nm dem notwendigen Abstand für eine Interaktion mit HA-Trimeren in Betracht. Das Vorliegen einer trivalenten Interaktion der Kapside mit HA-Trimeren konnte auch anhand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen belegt werden. Ob die bestimmte Affinität der Kapside gegen Viren allein auf eine trivalente Interaktion zurückgeführt werden konnte, müsste jedoch anhand von weiteren Bindungsstudien mit bHA belegt werden. Da die Affinitätswerte den KiHAI Werten aus HAI-Experimenten sehr nahe kommen, lässt sich die Inhibition auf eine vorwiegend affinitätsgetriebene Bindungsinhibition und weniger über einen sterischen Beitrag des Phagenkapsids bei der Bindungsinhibition erklären. Die Auflösungsgrenze des HAI-Tests liegt jedoch im nanomolaren Bereich, sodass eventuell in anderen Testverfahren noch geringere Inhibitionswerte bestimmt werden können. Würde man das trivalente Rezeptorcluster aus den Phagen auf andere kleinere Gerüstsysteme übertragen, sollten ähnliche Inhibitionswerte zu erwarten sein, falls der sterische Charakter des Gerüsts keine Rolle spielt. Denkbar wäre auch, dass das sphärische Phagengerüst eine wiederholte Rezeptorbindung (engl. *re-binding effect*) begünstigt, ein Effekt, der bisher noch kaum untersucht wurde. Auch die Vermittlung einer Virusaggregation wäre eine Möglichkeit, weswegen die Phagengerüste geeigneter als trivalente Binder wären.

Auch für die Phagengerüste konnte eine Abstandsabhängigkeit bei der SA-Rezeptorseparierung gefunden werden. Für drei H3-Typen erwies sich der Phage Q β [Sia1] als bester Inhibitor. Dem entgegen stehen Messergebnisse mit zwei H1-Typen, für deren Neutralisierung sich eine größere Rezeptortrennung eignete. Aviäre Stämme konnten dabei von keinem der Binder inhibiert werden. Diese Ergebnisse stimmen auch mit den Messungen mit den bivalenten PNA-DNA-Bindern überein (Abschnitt 5.9).

Eindrucksvoll war auch der Verstärkungsfaktor von 560.000, der mit dem Binder Q β [Sia1] im Vergleich zu dem monovalenten Binder α -2,6-SL bestimmt werden konnte. Elektronenmikroskopische Untersuchungen belegten, dass auch einzelne HA-Trimere an das Phagenkapsid Q β [Sia1] binden können. Ob sich die IAV-Inhibition von den Phagenkapsiden allein auf eine trivalente Interaktion mit einzelnen HA-Trimeren zurückführen lässt, müsste jedoch anhand weiterer Studien validiert werden. Würde dies zutreffen, könnte über die Verwendung einzelner trivalenter Rezeptorcluster der multivalente Verstärkungseffekt noch einmal um den Faktor 60 erhöht werden. Ein geeignetes starres Gerüst könnte bspw. das HSB-Protein darstellen, das für eine trivalente Interaktion mit HA von der Gruppe um Strauch beschrieben wurde ([Strauch, Bernard et al. 2017](#)). Waldmann und Kollegen entwickelten bereits ein trivalentes Sialosid auf der Basis eines flexiblen Peptidgerüsts gegen HA aus A/Vietnam (H5N1). Dabei bestimmten sie einen K_D -Wert von 446 nM aus Affinitätsmessungen und einen IC_{50} -Wert von 15 μ M aus Bindungskompetitionsexperimenten ([Waldmann, Jirmann et al. 2014](#)). Obwohl die Bindungswerte eindrucksvoll sind, zeigt unsere Studie an den Phagenkapsiden, dass über eine starre Rezeptorpräsentation deutlich stärkere Affinitätswerte ($K_{D,app}$ Q β [Sia1] = 1,3 nM) erzielt werden können und dass diese Binder auch in zellbasierten Inhibitionsstudien in der Lage sind, nanomolare Inhibitionswerte zu erzielen.

Anhand der gegenwärtigen Studie wurde auch der Aspekt einer rezeptorabhängigen Serospezifität untersucht. Durch eine Konjugation der Phagenkapside mit α -2,6-SL als Rezeptor für humanpathogene IAV-Stämme oder α -2,3-SL als Rezeptor für aviärpathogene Stämme konnte eine Diskriminierung dieser beiden Virustypen erzielt werden. Auf dieser Grundlage könnten Phagenkapside auch für diagnostische Zwecke zur Serotypisierung neuer IAV-Stämme verwendet werden. Eine Verabreichung einer Mischung beider Phagenkapsidvarianten würde außerdem im Hinblick auf eine therapeutische Anwendung eine Breitenwirksamkeit ermöglichen, insbesondere wenn bei einer bedrohlichen und akuten IAV-Infektion der Virustyp nicht bekannt ist und eine Diagnostik wertvolle Zeit beanspruchen würde.

Obwohl der vielversprechende Binder Q[Sia1] in *in vitro* Infektionsstudien ebenfalls nanomolare Inhibitionswerte erzielen konnte und auch eine Infektionsinhibition im Mausmodell gezeigt

werden konnte, stellen aktuell der Synthesemaßstab und die Aufreinigungsprozedur einer größeren Proteinmenge eine Herausforderung dar. Phagenkapside werden zwar bereits für eine multivalente Präsentation von Vakzinen verwendet, jedoch sind hier auch weit geringere Proteinmengen für eine Immunisierung notwendig. Unabhängig von aktuellen Limitationen einer therapeutischen Anwendung von Phagenkapsiden erwiesen sich diese Binder dennoch als nützliches Multivalenzmodell zur Bestimmung struktureller Notwendigkeiten für eine optimale Interaktion mit HA-Trimeren.

5.11 Wahl der Gerüstgeometrie bei der Inhibition filamentöser IAV

Anhand der Bindungsstudien mit filamentösen und sphärischen Viren konnte ein stark erhöhtes Hämagglutinationspotential der filamentösen Viren gegenüber sphärischen Viren unter der Verwendung gleicher Proteinmengen erzielt. Des Weiteren konnte aus Bindungsstudien mit filamentösen Viren an planaren Oberflächen längere Dissoziationsraten bestimmt werden. Diese Befunde sind nicht verwunderlich, wenn man bedenkt, dass filamentöse Viren eine größere Interaktionsfläche mit multivalenten Oberflächen erlauben.

Obwohl eine Vielzahl an IAV-Inhibitoren anhand des vorwiegend sphärischen A/X31 (H3N2) durchgeführt wurden, weisen Virusisolate aus Patienten eher filamentöse Formen auf ([Dadonaite, Vijayakrishnan et al. 2016](#)). Binder mit größerer Interaktionsfläche, wie bspw. flächige oder röhrenförmige Kohlenstoffgerüste, könnten eine geeignete Plattform für die Interaktion mit filamentösen Viren darstellen. Einige Studien an Graphenblättern demonstrierten bereits eine Eignung für eine multivalente Rezeptorpräsentation mit antiviralem Potential ([Sametband, Kalt et al. 2014](#), [Gholami, Lauster et al. 2017](#)). Darüber hinaus könnten sich auch die in der vorliegenden Arbeit untersuchten PolyDNA-Stränge, sowie DNA-Netze oder filamentöse Proteingerüste, wie Flagellen von Bakterien, als neue Gerüstsysteme für eine großflächige Interaktion mit filamentösen Influenzaviren eignen.

6. Schlussfolgerung und Ausblick

Anhand der vorliegenden Studie konnten verschiedene Aspekte mit bedeutender Relevanz für die Multivalenzforschung und insbesondere für die Entwicklung neuer IAV-Inhibitoren identifiziert werden. Unter der Verwendung eines weitreichenden Methodenspektrums, konnten die molekularen Notwendigkeiten für die Gewinnung von effizienten multivalenten IAV-Bindern bestimmt werden.

Neben SA als natürlichen IAV-Rezeptor wurden die beiden neuen Antikörperpeptide PeB und PeB^{GF} als alternative Rezeptoren identifiziert. Die Gewinnung von Peptiden aus Antikörpern und die Adaptionfähigkeit der Peptidsequenz bei der Bindung an konservierte HA-Epitope, repräsentiert eine attraktive Lösungsstrategie bei der Suche nach antiviralen Bindern gegen resistente IAV-Stämme. Eine Problematik, die mit Sialosiden aufgrund ihrer Strukturmanifestation wohl kaum umgangen werden kann. Der geringe Verstärkungseffekt multivalenter Peptid-PG-Konjugate bei der Inhibition von IAV zeigt jedoch deutlich, dass weitere Optimierungsarbeiten an der Peptidstruktur (bspw. durch Zyklisierung) vorgenommen werden müssen, um noch bessere Inhibitoren zu generieren. Darüber hinaus wäre ein weiterführender Schritt die Untersuchung der Eignung von Polymergerüsten, die eine multivalente Interaktion mit der hochkonservierten HA2-Domäne ermöglichen.

Bei den Studien mit den sphärischen PGSA und Peptid-PG-Bindern zeigte sich, dass sich große Polymergerüste mit geringer Rezeptordichte besser für eine Inhibition von IAV eignen als kleinere Gerüste oder höhere Rezeptordichten. Die Infektionsstudien im Mausmodell zeigten für die PGSA-Binder, dass sich lineare Polymere besser für eine IAV-Hemmung *in vivo* eignen. Als Ursache könnte eine verringerte Endozytose oder verminderte Interaktion mit der Muzinschicht in Betracht gezogen werden. Diesbezüglich wären Interaktionsstudien der entwickelten Inhibitoren mit den biologischen Barrieren (Muzinschicht, Mikrobiota, Lungenepithel) im respiratorischen Trakt die nächsten logischen Schritte bei der Weiterentwicklung der antiviralen Binder. Im Falle einer weitreichenden Penetrationsfähigkeit durch das Lungenepithel oder einem zellvermittelten systemischen Transport der multivalenten Binder, wären auch Erkenntnisse über die pharmakokinetischen Faktoren bei der Verteilung und dem Abbau der PG-basierten IAV-Inhibitoren aufschlussreich für die Weiterentwicklung dieser Substanzen. Darüber hinaus ist noch unbekannt, welche immunmodulatorischen Effekte von diesen Inhibitoren zu erwarten sind. Diese können von entscheidender Bedeutung für die Effizienz einer therapeutischen Anwendung sein.

Eine Rezeptorpräsentation auf den starren Nukleinsäuregerüsten und Phagenkapsiden demonstrierte eindrucksvoll, dass eine räumlich definierte Rezeptorausrichtung zu wesentlich besseren

antiviralen Eigenschaften führte als es mit einer zufälligen bzw. statistischen SA-Immobilisierung auf Polyglycerolen erzielt werden konnte. Als optimaler bivalenter Rezeptorabstand wurde anhand von HAI-Experimenten eine Distanz von 59 Å als identifiziert. Durch eine multiple Darstellung dieser bivalenten Rezeptorgruppen auf einem DNA-Strang, konnte sogar nanomolare Inhibitionswerte erzielt werden. Ähnliche Werte konnten auch mit dem Phagenkapsid Q β [Sia1] mit einem EG-Linker bestimmt werden. Interessant bei dieser Studie war neben dem Aspekt der Virusinhibition, dass die bestimmte Abstands-Affinitätsbeziehung nicht allgemeingültig für alle getesteten IAV-Stämme ist. Vielmehr konnte eine Serospezifität bei verschiedenen Rezeptorabständen gefunden werden. Demzufolge könnten die untersuchten starren Gerüststrukturen auch für eine Serotypisierung in der Diagnostik Verwendung finden. Abzielend auf eine breitenwirksame therapeutische Anwendung müssten die Gerüststrukturen weiter adaptiert werden. Verzweigte DNA-Polymere oder eine Präsentation von alternativen Rezeptoren (bspw. Peptiden) könnten hierbei eventuell dienlich sein.

Die Studie an den filamentösen Viren, welche eine höhere klinische Relevanz ausweisen als sphärische IAV, zeigte außerdem, dass die Entwicklung von multivalenten Influenzabindern noch lange nicht abgeschlossen ist. Mit anschmiegsamen Multivalenzträgern, wie bspw. Graphenplättchen, Kohlenstoffrohren oder linearen Biopolymeren, wie DNA, Bakterienflagellen oder muzinähnlichen Proteinen könnten zu verbesserten IAV-Bindern führen.

Obwohl diese Arbeit HA als antivirale Zielstruktur ins Visier nahm, konnte anhand von Tierexperimenten gezeigt werden, dass durch eine Kombinationstherapie des linearen HA-Binders LPG **1b** mit dem Neuraminidaseinhibitor Oseltamivircarboxylat ein höherer Schutz von Mäusen vor einer IAV-Infektion erreicht werden konnte als mit LPG **1b** allein. Die Entwicklung von multifunktionalen oder heterovalenten Polymersystemen könnte demzufolge zu einer weiteren Verbesserung der antiviralen Eigenschaften der untersuchten IAV-Inhibitoren darstellen. Insbesondere im Hinblick auf der Entstehung von Virusmutation, könnten solche Mehrkomponenteninhibitoren eine Resistenzentwicklung stark einschränken.

Weiterführende Informationen

Tabelle S1: Charakterisierung von LPGSAs (1a-1e) und dPGSAs (2a-2e und 3a-3d). Alle Substanzen wurden von Dr. Sumati Bhatia (Institut für Chemie und Biochemie, Freie Universität Berlin) hergestellt und physikochemisch charakterisiert.

Substanz ^[a] (PG _{MW} SA _{FG})	SA/ Polymer ^[b]	FG ^[c] (%)	D_h ^[d] (nm)	PDI ^[d]	SA/nm ² ^[e]
LPG ₁₀ 1	-	0	6,95±0,16	0,49±0,04	-
LPG ₁₀ SA _{0,10} 1a	14	10	9,81±2,13	0,45±0,06	0,09
LPG ₁₀ SA _{0,40} 1b	60	44	10,29±1,10	0,59±0,01	0,39
LPG ₁₀ SA _{0,70} 1c	99	73	10,24±1,05	0,32±0,04	0,65
LPG ₁₀ SA _{1,00} 1d	135	100	11,26±0,77	0,42±0,07	0,89
LPG ₁₀ SA _{0,2} 1e	27	20	7,17±0,35	0,68±0,01	0,17
dPG ₁₀ 2	-	0	5,99±0,37	0,37±0,02	-
dPG ₁₀ SA _{0,05} 2a	8	5	6,38±0,23	0,31±0,02	0,07
dPG ₁₀ SA _{0,15} 2b	26	15	7,52±0,17	0,63±0,01	0,23
dPG ₁₀ SA _{0,30} 2c	51	31	7,74±0,58	0,47±0,04	0,45
dPG ₁₀ SA _{0,65} 2d	106	64	9,17±0,58	0,54±0,06	0,94
dPG ₁₀ SA _{0,90} 2e	121	90	9,27±0,41	0,59±0,16	1,07
dPG ₅₀₀ 3	-	0	12,46±0,15	0,05±0,01	-
dPG ₅₀₀ SA _{0,05} 3a	358	5	11,76±0,40	0,15±0,01	0,73
dPG ₅₀₀ SA _{0,20} 3b	1235	19	14,20±0,27	0,07±0,01	2,53
dPG ₅₀₀ SA _{0,40} 3c	2470	38	14,69±0,26	0,12±0,01	5,06
dPG ₅₀₀ SA _{0,70} 3d	4550	70	15,77±1,54	0,50±0,01	9,32

[a] Mittlere Molmasse M_n nach Funktionalisierung mit SA, berechnet aus M_n des Polyglycerolkerns und des Funktionalisierungsgrades (FG). [b] Anzahl an SA pro Polymer wurde vom FG abgeleitet. [c] Aus ¹HNMR Analyse abgeleitet. [d] Hydrodynamischer Durchmesser (D_h) bestimmt aus DLS-Messungen in wässriger Pufferlösung (DPBS, pH 7,4). Dargestellte Werte repräsentieren den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten zusammen mit dem Standardfehler des Volumenverteilungsprofils. [e] Die durchschnittliche SA-Dichte der verschiedenen Gerüststrukturen wurde unter der Annahme einer sphärischen Morphologie berechnet. Hierfür wurde die Oberfläche einer Kugel (Durchmesser aus DLS-Messungen) durch die Anzahl an SA-Rezeptoren geteilt. Für nicht sialinierte Polymere wurden folgende Oberflächen berechnet: LPG₁₀ (A_{nm}^2) = 151, dPG₁₀ (A_{nm}^2) = 113, dPG₅₀₀ (A_{nm}^2) = 488.

Tabelle S2: HAI- und Zellinhibitionsexperimente mit LPG und dPG gegenüber A/X31 (H3N2). KiHAI- und IC₅₀-Werte sind respektive der SA- und NP-Konzentration dargestellt. KiHAI-Werte sind zusammen mit dem SEM (N≥3) und IC₅₀-Werte mit dem SE logIC₅₀ dargestellt.

Substanz (SA%, Gerüst)	KiHAI_{SA} [μM]	KiHAI_{NP} [nM]	Bindungs- inhibition IC _{50,SA} [mM]	Bindungs- inhibition IC _{50,NP} [μM]
LPG ₁₀ 1	-	2000000,0*	-	4000,00*
LPG ₁₀ SA _{0.10} 1a	2000,0*	139860,0*	2,30±0,05	164,14±3,57
LPG ₁₀ SA _{1.00} 1d	1000,0±0,0	7407,4±0,0	1,00*	7,41*
LPG ₁₀ SA _{0.2} 1e	1860,0±620,0	68888,9±22963,0	4,00*	148,15*
dPG ₁₀ 2	-	2000000,0*	-	4000,00*
dPG ₁₀ SA _{0.05} 2a	2000,0*	250000,0*	2,53±0,15	316,13±18,75
dPG ₁₀ SA _{0.30} 2c	62,5±0,0	1225,5±0,0	1,93±0,05	37,75±0,98
dPG ₁₀ SA _{0.65} 2d	57,3±21,6	540,5±203,8	1,02±0,17	9,65±1,60
dPG ₁₀ SA _{0.90} 2e	25000,0±0,0	206612,6±0,0	n.d.	n.d.
dPG ₅₀₀ 3	-	2000000,0*	-	4000,00*
dPG ₅₀₀ SA _{0.05} 3a	2000,0*	5587,0*	n.d.	n.d.
dPG ₅₀₀ SA _{0.40} 3c	666,7±166,7	269,9±67,5	3,42±0,03	1,39±0,01
dPG ₅₀₀ SA _{0.70} 3d	50000,0±0,0	10989,0±0,0	n.d.	n.d.

stellt.

Tabelle S3: Infektionsinhibitorenswerte aus Zellviabilitätstests mit LPGSA und dPGSA gegenüber A/X31 (H3N2). Die IC₅₀-Werte sind respektive ihrer SA- und NP-Konzentration zusammen mit dem SE logIC₅₀ dargestellt. n.b. = nicht bestimmt. Die maximale Konzentration, bis zu der keine Inhibition festgestellt werden konnte, wurde mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

Substanz (PG _{MW} SA _{FG})	Infektions- inhibition IC _{50,SA} [μM]	Infektions- inhibition IC _{50,NP} [nM]
LPG ₁₀ SA _{0.10} 1a	43,16±0,12	3,08±8,57
LPG ₁₀ SA _{1.00} 1d	16,15±0,74	119,63±5,48
LPG ₁₀ SA _{0.2} 1e	4,85±0,22	179,44±0,22
dPG ₁₀ 2	-	10000,00
dPG ₁₀ SA _{0.05} 2a	500,00*	62,50*
dPG ₁₀ SA _{0.30} 2c	1,84±0,06	36,14±1,17
dPG ₁₀ SA _{0.65} 2d	1,86±0,29	15,40±2,74
dPG ₁₀ SA _{0.90} 2e	n.b.	n.b.
dPG ₅₀₀ 3	-	500000,00*
dPG ₅₀₀ SA _{0.05} 3a	500,00*	1,40*
dPG ₅₀₀ SA _{0.40} 3c	1,07±0,15	0,43±0,06
dPG ₅₀₀ SA _{0.70} 3d	n.b.	n.b.

Tabelle S4: Übersicht über alle PG-Peptidkonjugate. Alle 15 PG-Peptidkonjugate wurden von Maria Glanz (FMP Berlin) synthetisiert und analytisch charakterisiert ([Lauster, Glanz et al. 2017](#)).

Substanz Abk.	Substanz	M _p ^[a] Kern [kDa]	FG ^[b] [%]	Pep. ^[c]	Durchmesser ^[d] [nm]	Dichte ^[e] [Pep./nm ²]
1a	dPG ₈	7,7	0	0	2,4 ± 0,1	0,0
1b	dPG ₈ PeB ₂₆	7,7	26	24	6,4 ± 0,7	1,3
1c	dPG ₈ PeB ₃₀ ^{GF}	7,7	30	31	10,3 ± 0,6	1,7
2a	dPG ₁₄	14,4	0	0	5,1 ± 0,5	0,0
2b	dPG ₁₄ PeB ₁₉	14,4	19	37	11,3 ± 3,1	0,5
2c	dPG ₁₄ PeB ₁₉ ^{GF}	14,4	19	36	11,3 ± 1,4	0,5
3a	dPG ₁₀₀	100	0	0	8,0 ± 0,4	0,0
3b	dPG ₁₀₀ PeB ₈	100	8	108	16,5 ± 2,7	0,5
3c	dPG ₁₀₀ PeB ₂₁	100	21	284	20,2 ± 2,2	1,4
3d	dPG ₁₀₀ PeB ₁₀ ^{GF}	100	10	165	22,4 ± 2,8	0,7
3e	dPG ₁₀₀ PeB ₂₉ ^{GF}	100	29	392	15,1 ± 0,7	2,0
4a	dPG ₃₄₀	340	0	0	11,7 ± 0,4	0,0
4b	dPG ₃₄₀ PeB ₉	340	9	414	17,9 ± 0,9	1,0
4c	dPG ₃₄₀ PeB ₁₅	340	15	690	24,8 ± 4,3	1,7
4d	dPG ₃₄₀ PeB ₁₀ ^{GF}	340	10	460	27,6 ± 5,9	1,1
4e	dPG ₃₄₀ PeB ₁₆ ^{GF}	340	16	736	29,8 ± 1,4	1,8

[a] Molmasse am Maximalpeak (M_p) von dendritischen PG [b] Aus 1H-NMR Messungen ermittelter Funktionalisierungsgrad (FG). [c] Aus FG berechnete, durchschnittliche Peptidzahl (Pep.). [d] Bestimmter Polymerdurchmesser aus DLS-Messungen in 10 mM Ammoniumkarbonat. Dargestellt sind Mittelwerte mit dem SEM (N≥3). [e] Peptiddichte aus dem gemittelten Kugeldurchmesser unfunktionalisierter Polymerkerne geteilt durch die Anzahl an Peptiden.

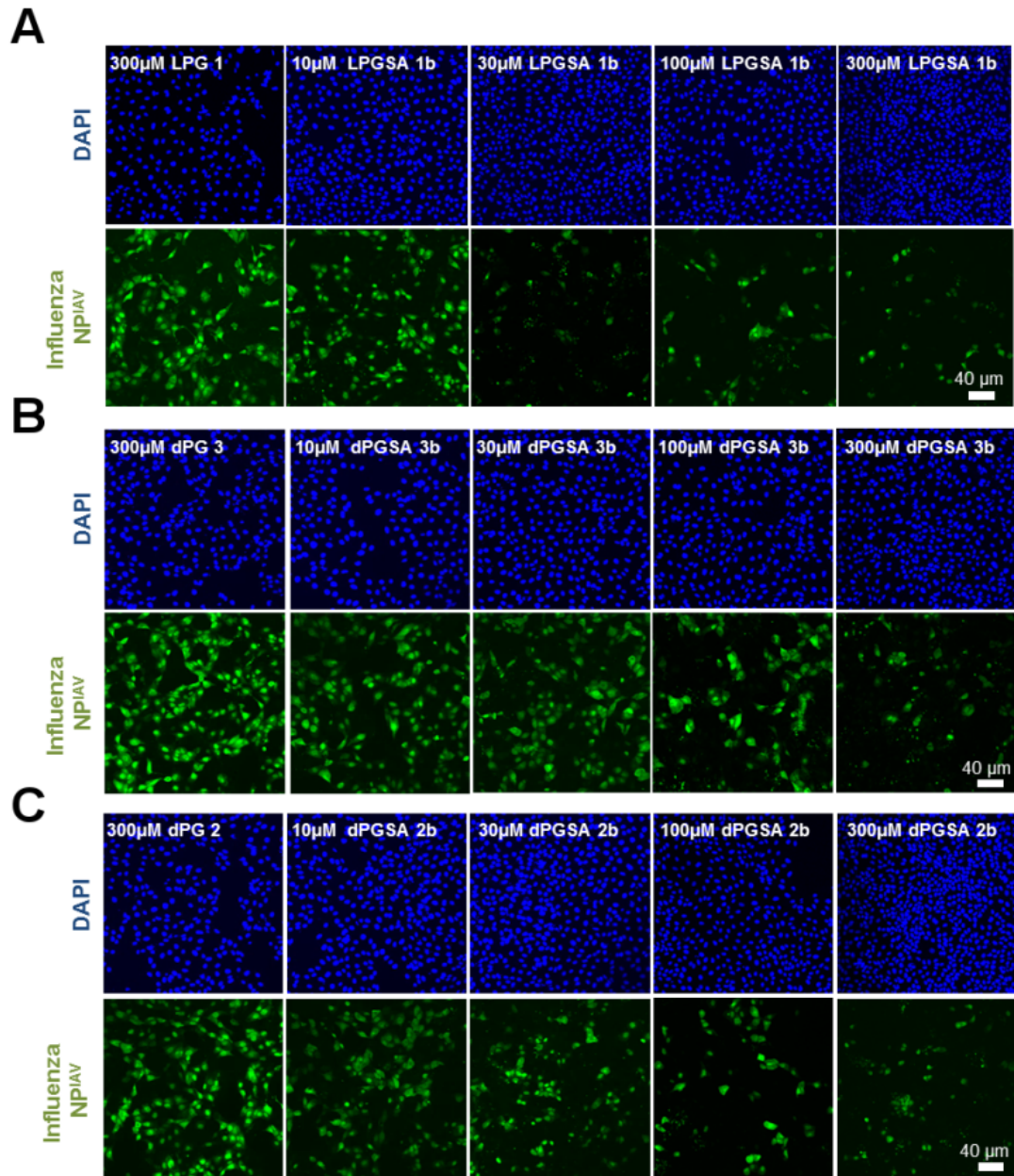


Abbildung S1: Immundetektion von IAV NP^{IAV} nach Infektion von MDCK-II Zellen in Gegenwart von PGSA. NP^{IAV}-Level 24 h nach Infektion mit A/X31 (H3N2) (MOI 0,1) in Gegenwart von PGSA (10-300 μM SA). Nichtsialinisierte Inhibitoren dienten als Kontrollsubstanzen und wurden bei einer Konzentration von 300 μM NP verwendet. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (obere Reihe) und virales NP^{IAV} wurde mit FITC und Alexa488 gekoppelten Antikörpern detektiert (untere Reihe).

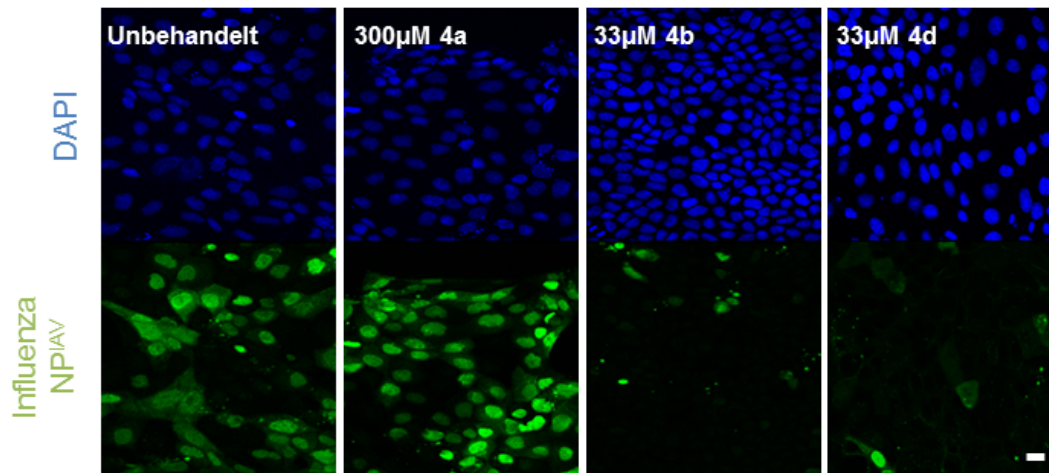


Abbildung S2: Immundetektion von IAV NP^{IAV} nach Infektion von MDCK-II Zellen in Gegenwart von PG-Peptid-Konjugaten. NP^{IAV}-Level 24 h nach Infektion mit A/X31 (H3N2) (MOI 0,1) in Gegenwart von dPG-Peptiden (33 μM). DPBS oder der nichtfunktionalisierte Inhibitoren 4a (* verweist auf eine 300 μM NP-Konzentration) wurden als Kontrollen herangezogen. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (obere Reihe) und virales NP^{IAV} wurde mit FITC und Alexa488 gekoppelten Antikörpern detektiert (untere Reihe). Der weiße Maßstab repräsentiert 20 μm.

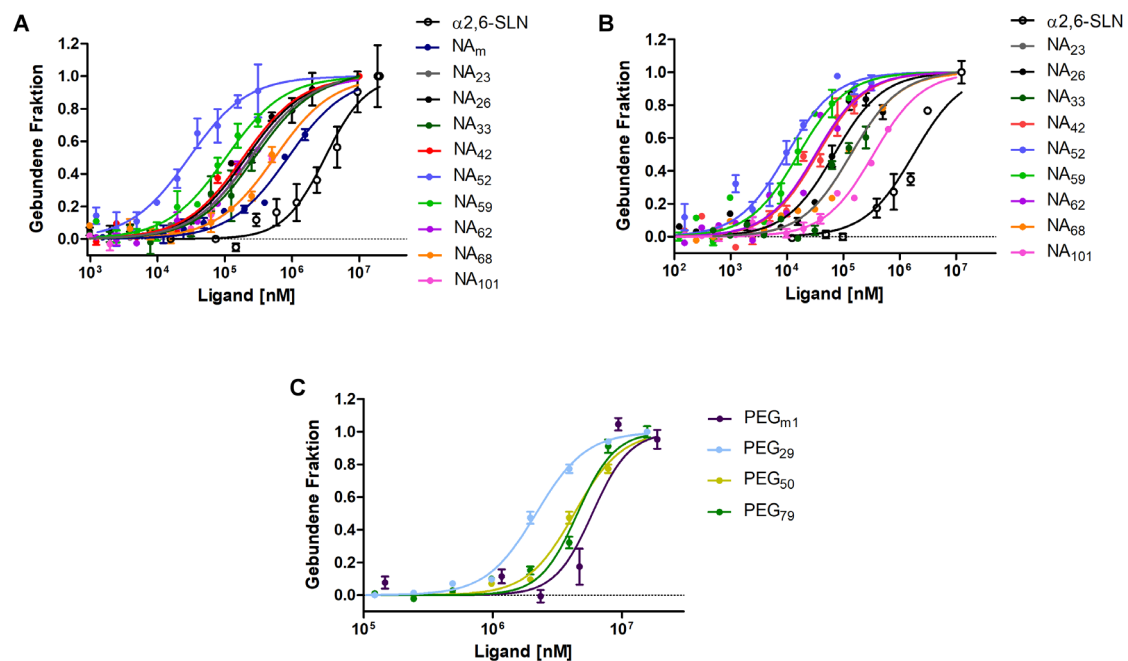


Abbildung S3: Bindungskurven aus MST-Messungen mit bivalenten PNA-DNA-Heteroduplexen und PEG basierten Bindern. MST-Messungen mit A) einem monovalenten und diversen bivalenten PNA-DNA basierten Bindern oder dem Trisaccharid α -2,6-SLN gegenüber Alexa647-bHA, B) bivalenten PNA-DNA-Bindern gegenüber R18-markierten A/X31 (H3N2) Viren und C) mit mono- und bivalenten PEG-Bindern gegenüber Alexa647-bHA. Die Fehlerbalken in Abbildung A-C verweisen auf den SEM ($N \geq 3$). Datenpunkte wurden über die Funktion des Massenwirkungsgesetzes mit Kurven angepasst.

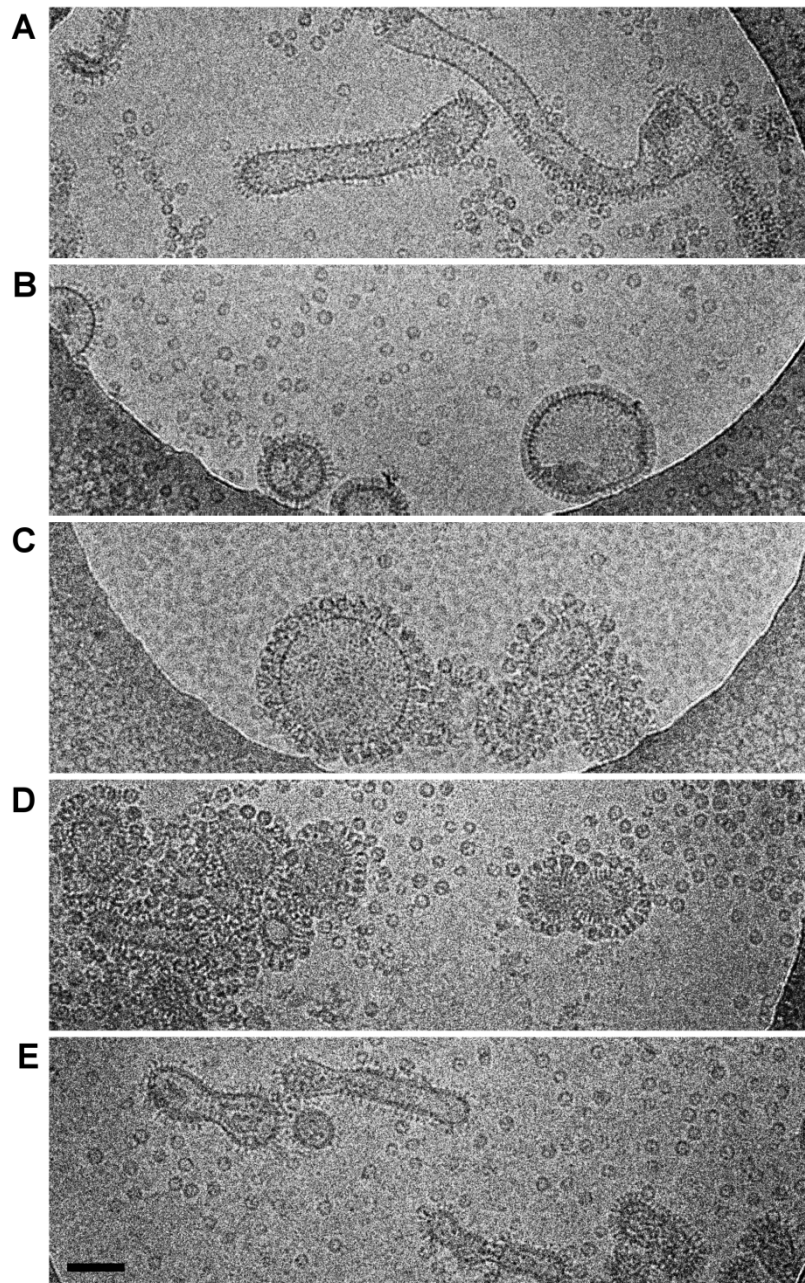


Abbildung S4: EM-Nachweis der Bindung von Phagenkapsiden an Influenzaviren. Cryo-EM Aufnahmen von A/X31 (H3N2) Viren nach Inkubation mit A) unfunktionalisierten, B) Qβ [Gal3], C) Qβ [Sia1], D) Qβ [Sia3], E) Qβ [Sia5] Phagenkapsiden. Der Maßstab repräsentiert 100 nm. Die Bilder wurden von Dr. Kai Ludwig (FU Berlin) aufgenommen und zur Verfügung gestellt.

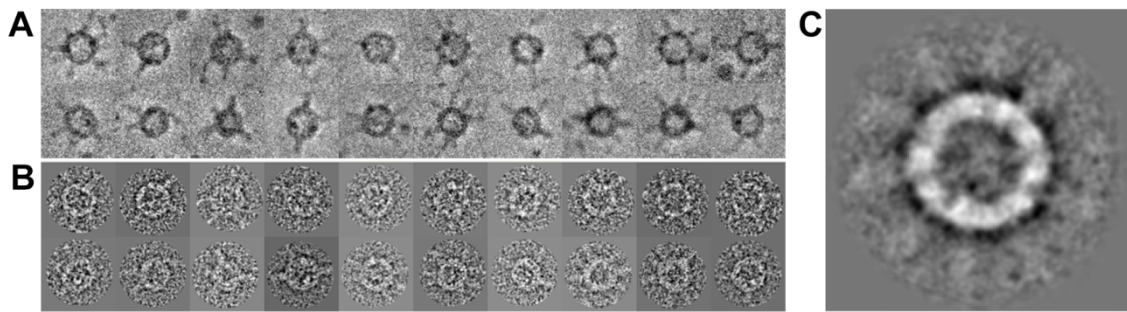


Abbildung S5: Cryo-EM Aufnahmen der Bindung von HA-Trimeren aus A/X31 (H3N2), an Q β -Phagenkapside. A) Bildserie von 20 Einzelaufnahmen aus einer Cryo-EM-Präparation von Q β [Sia1], das mit Bromelain verdautem HA (bHA) aus A/X31 (H3N2) inkubiert wurde. B) Darstellung der Einzelaufnahmen aus A nach Überarbeitung mit einem Bandbreitenfilter und räumlicher Alignierung. C) Summenbild aus 64 Einzelaufnahmen. Die Bilder wurden von Dr. Kai Ludwig (FU Berlin) aufgenommen und zur Verfügung gestellt.

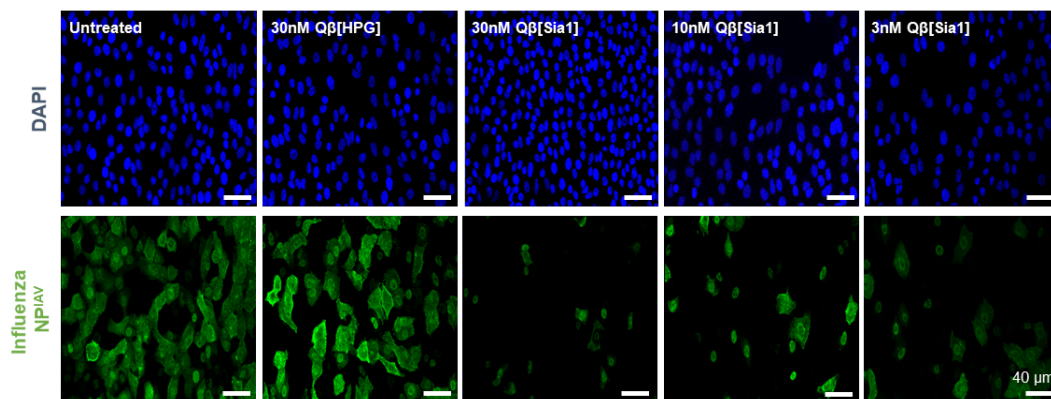


Abbildung S6: Immundetektion von NP^{IAV} 6 h nach Infektion von A549-Zellen in Gegenwart von Q β -Phagenkapsiden. Nachweis des NP^{IAV}-Levels 6h nach Infektion von A549-Zellen, die mit Q β -Phagenkapsid (3-30 nM) vorbehandelten A/Panama (H3N2) Viren (MOI 1) infiziert wurden. Unbehandelte Viren und solche, die mit dem Kontrollbinder Q β [HPG] behandelt wurden dienten als Kontrolle. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (obere Reihe) und virales NP^{IAV} wurde mit FITC und Alexa488 gekoppelten Antikörpern detektiert (untere Reihe).

Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Veröffentlichte Artikel

1. Bandlow, V., Liese, S., **Lauster, D.**, Ludwig, K., Netz, R. R., Herrmann, A. and Seitz, O. (2017). Spatial Screening of Hemagglutinin on Influenza A Virus Particles: Sialyl-LacNAc Displays on DNA and PEG Scaffolds Reveal the Requirements for Bivalency Enhanced Interactions with Weak Monovalent Binders. *J Am Chem Soc* 139(45): 16389-16397.
2. Bhatia, S.[¶], **Lauster, D.**[¶], Bardua, M., Ludwig, K., Angioletti-Uberti, S., Popp, N., Hoffmann, U., Paulus, F., Budt, M., Stadtmüller, M., Wolff, T., Hamann, A., Böttcher, C., Herrmann, A. and Haag, R. (2017). Linear polysialoside outperforms dendritic analogs for inhibition of influenza virus infection in vitro and in vivo. *Biomaterials* 138: 22-34.
3. **Lauster, D.**[¶], Glanz, M.[¶], Bardua, M., Ludwig, K., Hellmund, M., Hoffmann, U., Hamann, A., Böttcher, C., Haag, R., Hackenberger, C. P. R. and Herrmann, A. (2017). Multivalent Peptide-Nanoparticle Conjugates for Influenza-Virus Inhibition. *Angew Chem Int Ed Engl* 56(21): 5931-5936.
4. **Lauster, D.**[¶], Glanz, M.[¶], Bardua, M., Ludwig, K., Hellmund, M., Hoffmann, U., Hamann, A., Böttcher, C., Haag, R., Hackenberger, C. P. R. and Herrmann, A. (2017). Multivalente Peptid-Nanopartikel-Konjugate zur Hemmung des Influenzavirus. *Angew Chem* 129(21): 6025-6030.
5. Gholami, M. F.[¶], **Lauster, D.**[¶], Ludwig, K., Storm, J., Ziem, B., Severin, N., Böttcher, C., Rabe, J. P., Herrmann, A., Adeli, M. and Haag, R. (2017). Functionalized Graphene as Extracellular Matrix Mimics: Toward Well-Defined 2D Nanomaterials for Multivalent Virus Interactions. *Adv. Funct. Mater.* 27(15): 1606477.
6. Memczak, H.[¶], **Lauster, D.**[¶], Kar, P., Di Lella, S., Volkmer, R., Knecht, V., Herrmann, A., Ehrentreich-Förster, E., Bier, F.F., Stöcklein, W.F.M., (2016). Anti-Hemagglutinin Antibody Derived Lead Peptides for Inhibitors of Influenza Virus Binding, *PLoS ONE*, 11(7): e0159074
7. **Lauster, D.**, Pawolski, D., Storm, J., Ludwig, K., Volkmer, R., Memczak, H., Herrmann, A., Bhatia, S. (2015). Potential of Acylated Peptides to Target the Influenza A Virus, *Beilstein J. Org. Chem.*, 11: 589–595
8. **Lauster, D.**, Vazquez, O., Schwarzer, R., Seitz, O., Herrmann, A. (2015). Potential of Proapoptotic Peptides to Induce the Formation of Giant Plasma Membrane Vesicles with Lipid Domains; *ChemBioChem*, 16: 1288–1292
9. Al-zeer, M. A., Al-Younes, H. M., **Lauster, D.**, Abu-Lubad, M., Meyer, T. F. (2013). Autophagy restricts Chlamydia trachomatis Growth in Human Macrophages via IFNG-inducible Guanylate Binding Proteins, *Autophagy*, 9(1), 50–62

[¶] zu gleichen Anteilen zur Studie beigetragen.

Veröffentlichte Patente

1. Haag, R., Herrmann, A., Bhatia, S., **Lauster, D.**, (2017). Linear Polyglycerol Derivatives, a Method for Manufacturing and Applications. Europäische Patentanmeldung, EP3199566A1.
2. Möser, C., **Lauster, D.**, Lorenz, J.S., Herrmann, A., Stöcklein, W., Smith, D.M., (2017). Nanostructure with Nucleic Acid Scaffold and Virus-Binding Peptide Moieties. Europäische Patentanmeldung, EP17173022.9.
3. Memczak, H., Stöcklein, W., Ehrentreich-Förster, E., Bier, F.F., **Lauster, D.**, Herrmann, A. (2016). Peptides for Binding of Influenza Viruses and Inhibition of Influenza Infections. Europäische Patentanmeldung, EP20140193922.

Vorträge und Posterpräsentationen

- Vortrag bei SFB765 PhD Student Symposium, 2013, Rheinsberg
- Vortrag am CNRS Gif-Sur-Yvette, 2013
- Gastgeber für Prof. Dr. Whitesides (Harvard, MA, USA) im "Berlin Life Science" Kolloquium, 2013, Berlin
- Posterpräsentation bei Nanotemper GmbH, 2014, München
- Vortrag auf der 58th Biophysical Society Konferenz, 2014, San Francisco, USA
- Posterpräsentation auf ECBS-ICBS Konferenz, 2015, Berlin
- Posterpräsentation auf Max-Planck-Symposium zu "Host-directed therapy", 2015, Berlin
- Vortrag und Posterpräsentation auf der ICAR-ISAR Konferenz, 2016, La Jolla, USA

Auszeichnungen

- International Max-Planck Research School (IMPRS) Stipendium
- 58th Biophysical Society, Reisestipendium
- ICAR-ISAR 2016, Reisestipendium

Laborbesuche und Workshops

- Laborbesuch am CNRS (Gif-Sur-Yvette, 2013)
- Laborbesuch an der Universiteit Utrecht, Niederlande, 2013
- Workshop bei Nanotemper GmbH, München, 2014
- Workshop bei Charité, Entrepreneurship, Berlin, 2015

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich gerne allen Arbeitskollegen und Kooperationspartnern, die mich während der Promotionszeit begleitet haben, sowie Freunden und meiner Familie meinen tiefsten Dank aussprechen.

Ganz besonders danke ich **Prof. Dr. Andreas Herrmann** für seine vertrauensvolle, motivierende und unterstützende Art. Er war ein toller Mentor und gewährte mir viele Freiheiten beim Umsetzen eigener Ideen, wodurch es mir möglich war viele wissenschaftliche Kompetenzen zu erwerben. Seine gute Laune und sein Humor halfen mir auch anstrengende Zeiten durchzustehen. Darüber hinaus hat mich seine wissenschaftliche Denkweise sehr inspiriert und wird mir auch auf meinem weiteren Karriereweg in Erinnerung bleiben.

Außerdem möchte ich **Prof. Dr. Rainer Haag** für seine wissenschaftlichen und karrierebezogenen Ratschläge danken. Er weiß es junge Wissenschaftler zu motivieren und ihnen Mut zu machen.

Als stetigen Verbündeten in der Multivalenzforschung möchte ich auch **Dr. Kai Ludwig** danken. Seine Erfahrung, Kompetenz und Liebe zum Detail waren eine große Inspiration und wertvolle Hilfe.

Bei meinen Laborkollegen möchte ich mich ebenfalls für das kollegiale Arbeitsklima, sowie für das Teilen von Expertisen und Süßigkeiten bedanken. Insbesondere möchte ich hierbei **Matthias Schade, Dr. Ivan Haralampiev, Dr. Carolin Mair, Prof. Salvo Chiantia, Dr. Santiago Di Lella, Dr. Andrea Gramatica, Dr. Chris Höfer, Madlen Luckner, Lotte Teufel, Dr. Gabrielle Schreiber, Dr. Thomas Korte, Dr. Peter Müller, Sabine Schiller, Gudrun Habermann** und **Silvia Kietzmann** meinen Dank aussprechen. Auch **Dr. Christian Sieben**, der mich in die Multivalenzforschung eingeführt hat und **Malte Hilsch**, der mir in der letzten Phase meiner Promotion als SFB765-Partner dabei geholfen hat Zeit für das Schreiben der Dissertation zu finden, möchte ich herzlich danken.

Dem SFB765 für Multivalenz beizuwohnen war eine tolle Erfahrung für mich: Der konstante Informationsaustausch mit Chemikern, Physikern und Theoretikern gewährte mir viele interessante Einblicke, die mir andernfalls verborgen geblieben wären. Dafür und für die vielen schönen Momente möchte ich mich insbesondere bei **Dr. Sumati Bhatia, Dr. Luis Camacho, Victor Bandlow, Dr. Susanne Liese, Valentin Reiter, Simon Klenk, Maria Glanz** und **Dr. Sandra Sänger** bedanken.

Auch Kooperationspartnern außerhalb des SFB765 möchte ich meinen Dank aussprechen: **Dr. Bastian Thaa, PD Michael Veit, Dr. Henry Memczak, Dr. Walter Stöcklein, David Smith** und **Christin Möser**.

Bei den Bachelor- und Masterstudenten, **Nicole Popp, Damian Pawolski, Julian Storm, Moritz Drüke, Anna Kremer, Christian Schultz** und **Diana Steinkampf**, die ich bei der Absolvierung ihrer Abschlussarbeiten mitbetreute, möchte ich mich herzlich bedanken. Es war mir immer eine Freude ihnen mit Rat und Tat zur Seite zu stehen

Aus meinem Freundeskreis danke ich besonders **Oliver Hasprich, Markus Bardua** und **Uwe Ackermann**.

Zuletzt danke ich meinen Eltern, meiner Schwester und meiner Nichte Emily für ihre Liebe und Energie.

Literaturverzeichnis

- Abendroth, F., Bujotzek, A., Shan, M., Haag, R., Weber, M. and Seitz, O. (2011). DNA-Controlled Bivalent Presentation of Ligands for the Estrogen Receptor. *Angewandte Chemie International Edition* 50(37): 8592-8596.
- Air, G. M. (2012). Influenza neuraminidase. *Influenza Other Respir Viruses* 6(4): 245-256.
- Altmann, S. E., Brandt, C. R., Jahrling, P. B. and Blaney, J. E. (2012). Antiviral activity of the EB peptide against zoonotic poxviruses. *Virology Journal* 9(1): 6.
- Altmann, S. E., Jones, J. C., Schultz-Cherry, S. and Brandt, C. R. (2009). Inhibition of vaccinia virus entry by a broad spectrum antiviral peptide. *Virology* 388.
- Badham, M. D. and Rossman, J. S. (2016). Filamentous Influenza Viruses. *Curr Clin Microbiol Rep* 3(3): 155-161.
- Bandlow, V., Liese, S., Lauster, D., Ludwig, K., Netz, R. R., Herrmann, A. and Seitz, O. (2017). Spatial Screening of Hemagglutinin on Influenza A Virus Particles: Sialyl-LacNAc Displays on DNA and PEG Scaffolds Reveal the Requirements for Bivalency Enhanced Interactions with Weak Monovalent Binders. *J Am Chem Soc* 139(45): 16389-16397.
- Baum, L. G. and Paulson, J. C. (1990). Sialyloligosaccharides of the respiratory epithelium in the selection of human influenza virus receptor specificity. *Acta Histochem Suppl* 40: 35-38.
- Bhatia, S., Lauster, D., Bardua, M., Ludwig, K., Angioletti-Uberti, S., Popp, N., Hoffmann, U., Paulus, F., Budt, M., Stadtmüller, M., Wolff, T., Hamann, A., Böttcher, C., Herrmann, A. and Haag, R. (2017). Linear polysialoside outperforms dendritic analogs for inhibition of influenza virus infection in vitro and in vivo. *Biomaterials* 138: 22-34.
- Blaising, J., Polyak, S. J. and Pecheur, E. I. (2014). Arbidol as a broad-spectrum antiviral: an update. *Antiviral Res* 107: 84-94.
- Böttcher-Friebertshäuser, E., Garten, W., Matrosovich, M. and Klenk, H. D. (2014). The hemagglutinin: a determinant of pathogenicity. *Curr Top Microbiol Immunol* 385: 3-34.
- Boulo, S., Akarsu, H., Ruigrok, R. W. and Baudin, F. (2007). Nuclear traffic of influenza virus proteins and ribonucleoprotein complexes. *Virus Res* 124(1-2): 12-21.
- Bui, C. M., Chughtai, A. A., Adam, D. C. and MacIntyre, C. R. (2017). An overview of the epidemiology and emergence of influenza A infection in humans over time. *Arch Public Health* 75: 15.
- Calder, L. J., Wasilewski, S., Berriman, J. A. and Rosenthal, P. B. (2010). Structural organization of a filamentous influenza A virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(23): 10685-10690.
- Childs, R. A., Palma, A. S., Wharton, S., Matrosovich, T., Liu, Y., Chai, W., Campanero-Rhodes, M. A., Zhang, Y., Eickmann, M., Kiso, M., Hay, A., Matrosovich, M. and Feizi, T. (2009). Receptor-binding specificity of pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus determined by carbohydrate microarray. *Nat Biotechnol* 27(9): 797-799.
- Choi, S. K. (2004). *Synthetic multivalent molecules concepts and biomedical applications*. Hoboken, N.J., Wiley.
- Choi, S. K., Mammen, M. and Whitesides, G. M. (1996). Monomeric inhibitors of influenza neuraminidase enhance the hemagglutination inhibition activities of polyacrylamides presenting multiple C-sialoside groups. *Chemistry and Biology* 3(2): 97-104.
- Cohen, M., Zhang, X. Q., Senaati, H. P., Chen, H. W., Varki, N. M., Schooley, R. T. and Gagneux, P. (2013). Influenza A penetrates host mucus by cleaving sialic acids with neuraminidase. *Virol J* 10: 321.

- Colpitts, C. C., Ustinov, A. V., Epand, R. F., Epand, R. M., Korshun, V. A. and Schang, L. M. (2013). 5-(Perylen-3-yl)ethynyl-arabino-uridine (aUY11), an arabino-based rigid amphipathic fusion inhibitor, targets virion envelope lipids to inhibit fusion of influenza virus, hepatitis C virus, and other enveloped viruses. *J Virol* 87(7): 3640-3654.
- Connaris, H., Govorkova, E. A., Ligertwood, Y., Dutia, B. M., Yang, L., Tauber, S., Taylor, M. A., Alias, N., Hagan, R., Nash, A. A., Webster, R. G. and Taylor, G. L. (2014). Prevention of influenza by targeting host receptors using engineered proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(17): 6401-6406.
- Corti, D., Cameroni, E., Guarino, B., Kallewaard, N. L., Zhu, Q. and Lanzavecchia, A. (2017). Tackling influenza with broadly neutralizing antibodies. *Curr Opin Virol* 24: 60-69.
- Crocker, P. R., Paulson, J. C. and Varki, A. (2007). Siglecs and their roles in the immune system. *Nat Rev Immunol* 7(4): 255-266.
- Cross, G. (2002). Hemagglutination inhibition assays. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* 11(1): 15-18.
- Cross, T. A., Dong, H., Sharma, M., Busath, D. D. and Zhou, H. X. (2012). M2 protein from influenza A: from multiple structures to biophysical and functional insights. *Curr Opin Virol* 2(2): 128-133.
- Dadonaite, B., Vijayakrishnan, S., Fodor, E., Bhella, D. and Hutchinson, E. C. (2016). Filamentous influenza viruses. *J Gen Virol* 97(8): 1755-1764.
- Dai, C., Ma, Y., Zhao, Z., Zhao, R., Wang, Q., Wu, Y., Cao, Z. and Li, W. (2008). Mucroporin, the first cationic host defense peptide from the venom of *Lychas mucronatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 52(11): 3967-3972.
- Dam, T. K. and Brewer, C. F. (2002). Thermodynamic studies of lectin-carbohydrate interactions by isothermal titration calorimetry. *Chem Rev* 102(2): 387-429.
- Dankar, S. K., Wang, S., Ping, J., Forbes, N. E., Keleta, L., Li, Y. and Brown, E. G. (2011). Influenza A virus NS1 gene mutations F103L and M106I increase replication and virulence. *Virol J* 8: 13.
- de Graaf, M. and Fouchier, R. A. (2014). Role of receptor binding specificity in influenza A virus transmission and pathogenesis. *EMBO J* 33(8): 823-841.
- de Jong, M. D., Simmons, C. P., Thanh, T. T., Hien, V. M., Smith, G. J., Chau, T. N., Hoang, D. M., Chau, N. V., Khanh, T. H., Dong, V. C., Qui, P. T., Cam, B. V., Ha do, Q., Guan, Y., Peiris, J. S., Chinh, N. T., Hien, T. T. and Farrar, J. (2006). Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia. *Nat Med* 12(10): 1203-1207.
- Duhr, S. and Braun, D. (2006). Why molecules move along a temperature gradient. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(52): 19678-19682.
- Eisen, M. B., Sabesan, S., Skehel, J. J. and Wiley, D. C. (1997). Binding of the influenza A virus to cell-surface receptors: structures of five hemagglutinin-sialyloligosaccharide complexes determined by X-ray crystallography. *Virology* 232(1): 19-31.
- Eisfeld, A. J., Neumann, G. and Kawaoka, Y. (2015). At the centre: influenza A virus ribonucleoproteins. *Nat Rev Microbiol* 13(1): 28-41.
- Ewers, H., Romer, W., Smith, A. E., Bacia, K., Dmitrieff, S., Chai, W., Mancini, R., Kartenbeck, J., Chambon, V., Berland, L., Oppenheim, A., Schwarzmann, G., Feizi, T., Schwill, P., Sens, P., Helenius, A. and Johannes, L. (2010). GM1 structure determines SV40-induced membrane invagination and infection. *Nat Cell Biol* 12(1): 11-18.
- Fasting, C., Schalley, C. A., Weber, M., Seitz, O., Hecht, S., Koksche, B., Dornedde, J., Graf, C., Knapp, E. W. and Haag, R. (2012). Multivalency as a chemical organization and action principle. *Angew Chem Int Ed Engl* 51(42): 10472-10498.

- Ferguson, L., Olivier, A. K., Genova, S., Epperson, W. B., Smith, D. R., Schneider, L., Barton, K., McCuan, K., Webby, R. J. and Wan, X. F. (2016). Pathogenesis of Influenza D Virus in Cattle. *J Virol* 90(12): 5636-5642.
- Fleury, D., Wharton, S. A., Skehel, J. J., Knossow, M. and Bizebard, T. (1998). Antigen distortion allows influenza virus to escape neutralization. *Nat Struct Biol* 5(2): 119-123.
- Flory, P. J. (1953). Principles of polymer chemistry. Ithaca - N.Y., Cornell University Press 1953 ib.62.
- Fukuyama, S. and Kawaoka, Y. (2011). The pathogenesis of influenza virus infections: the contributions of virus and host factors. *Curr Opin Immunol* 23(4): 481-486.
- Gaffarogullari, E. C., Krause, A., Balbo, J., Hertel, D. P. and Jaschke, A. (2013). Microscale thermophoresis provides insights into mechanism and thermodynamics of ribozyme catalysis. *RNA Biol* 10(12): 1815-1821.
- Gambaryan, A. S., Tuzikov, A. B., Bovin, N. V., Matrosovich, M. N., Chinarev, A. A. and Juneja, L. R. (2002). Polymeric inhibitor of influenza virus attachment protects mice from experimental influenza infection. *Antiviral Research* 55(1): 201-205.
- Gambaryan, A. S., Tuzikov, A. B., Piskarev, V. E., Yamnikova, S. S., Lvov, D. K., Robertson, J. S., Bovin, N. V. and Matrosovich, M. N. (1997). Specification of receptor-binding phenotypes of influenza virus isolates from different hosts using synthetic sialylglycopolymers: non-egg-adapted human H1 and H3 influenza A and influenza B viruses share a common high binding affinity for 6'-sialyl(N-acetyl)lactosamine). *Virology* 232(2): 345-350.
- Genies, P.-G. (1993). Scaling concepts in polymer physics. Ithaca, Cornell University.
- Gholami, M. F., Lauster, D., Ludwig, K., Storm, J., Ziem, B., Severin, N., Böttcher, C., Rabe, J. P., Herrmann, A., Adeli, M. and Haag, R. (2017). Functionalized Graphene as Extracellular Matrix Mimics: Toward Well-Defined 2D Nanomaterials for Multivalent Virus Interactions. *Advanced Functional Materials* 27(15): 1606477-n/a.
- Glezen, W. P. (1996). Emerging infections: pandemic influenza. *Epidemiol Rev* 18(1): 64-76.
- Glick, G. D. and Knowles, J. R. (1991). Molecular Recognition of Bivalent Sialosides by Influenza Virus. *J. Am. Chem. Soc.* 113: 4701-4703.
- Gopinath, S. C., Misono, T. S., Kawasaki, K., Mizuno, T., Imai, M., Odagiri, T. and Kumar, P. K. (2006). An RNA aptamer that distinguishes between closely related human influenza viruses and inhibits haemagglutinin-mediated membrane fusion. *J Gen Virol* 87(Pt 3): 479-487.
- Granich, R., Crowley, S., Vitoria, M., Smyth, C., Kahn, J. G., Bennett, R., Lo, Y. R., Souteyrand, Y. and Williams, B. (2010). Highly active antiretroviral treatment as prevention of HIV transmission: review of scientific evidence and update. *Curr Opin HIV AIDS* 5(4): 298-304.
- Hamilton, B. S., Chung, C., Cyphers, S. Y., Rinaldi, V. D., Marcano, V. C. and Whittaker, G. R. (2014). Inhibition of influenza virus infection and hemagglutinin cleavage by the protease inhibitor HAI-2. *Biochem Biophys Res Commun* 450(2): 1070-1075.
- Hamilton, B. S., Whittaker, G. R. and Daniel, S. (2012). Influenza virus-mediated membrane fusion: determinants of hemagglutinin fusogenic activity and experimental approaches for assessing virus fusion. *Viruses* 4(7): 1144-1168.
- Harris, A., Cardone, G., Winkler, D. C., Heymann, J. B., Brecher, M., White, J. M. and Steven, A. C. (2006). Influenza virus pleiomorphy characterized by cryoelectron tomography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(50): 19123-19127.
- Hause, B. M., Ducatez, M., Collin, E. A., Ran, Z., Liu, R., Sheng, Z., Armien, A., Kaplan, B., Chakravarty, S., Hoppe, A. D., Webby, R. J., Simonson, R. R. and Li, F. (2013). Isolation of a

novel swine influenza virus from Oklahoma in 2011 which is distantly related to human influenza C viruses. *PLoS Pathog* 9(2): e1003176.

Hidari, K. I., Shimada, S., Suzuki, Y. and Suzuki, T. (2007). Binding kinetics of influenza viruses to sialic acid-containing carbohydrates. *Glycoconj J* 24(9): 583-590.

Hong, S., Leroueil, P. R., Majoros, I. J., Orr, B. G., Baker, J. R., Jr. and Banaszak Holl, M. M. (2007). The binding avidity of a nanoparticle-based multivalent targeted drug delivery platform. *Chem Biol* 14(1): 107-115.

Howley, P. M. and Knipe, D. M. (2007). *Fields Virology*, 5th Edition. Lippincott Williams & Wilkins.

Hrincius, E. R., Hennecke, A. K., Gensler, L., Nordhoff, C., Anhlán, D., Vogel, P., McCullers, J. A., Ludwig, S. and Ehrhardt, C. (2012). A single point mutation (Y89F) within the non-structural protein 1 of influenza A viruses limits epithelial cell tropism and virulence in mice. *Am J Pathol* 180(6): 2361-2374.

Hussain, M., Galvin, H. D., Haw, T. Y., Nutsford, A. N. and Husain, M. (2017). Drug resistance in influenza A virus: the epidemiology and management. *Infect Drug Resist* 10: 121-134.

Hutchinson, E. C., Charles, P. D., Hester, S. S., Thomas, B., Trudgian, D., Martinez-Alonso, M. and Fodor, E. (2014). Conserved and host-specific features of influenza virion architecture. *Nat Commun* 5: 4816.

Ito, T., Suzuki, Y., Mitnaul, L., Vines, A., Kida, H. and Kawaoka, Y. (1997). Receptor specificity of influenza A viruses correlates with the agglutination of erythrocytes from different animal species. *Virology* 227(2): 493-499.

Jeon, S. H., Kayhan, B., Ben-Yedidia, T. and Arnon, R. (2004). A DNA aptamer prevents influenza infection by blocking the receptor binding region of the viral hemagglutinin. *J Biol Chem* 279(46): 48410-48419.

Jerabek-Willemsen, M., André, T., Wanner, R., Roth, H. M., Duhr, S., Baaske, P. and Breitsprecher, D. (2014). MicroScale Thermophoresis: Interaction analysis and beyond. *Journal of Molecular Structure* 1077: 101-113.

Jones, J. C., Settles, E. W., Brandt, C. R. and Schultz-Cherry, S. (2011). Virus aggregating peptide enhances the cell-mediated response to influenza virus vaccine. *Vaccine* 29(44): 7696-7703.

Jones, J. C., Turpin, E. A., Bultmann, H., Brandt, C. R. and Schultz-Cherry, S. (2006). Inhibition of influenza virus infection by a novel antiviral peptide that targets viral attachment to cells. *J Virol* 80(24): 11960-11967.

Junankar, P. R. and Cherry, R. J. (1986). Temperature and pH dependence of the haemolytic activity of influenza virus and of the rotational mobility of the spike glycoproteins. *Biochim Biophys Acta* 854(2): 198-206.

Kadam, R. U. and Wilson, I. A. (2017). Structural basis of influenza virus fusion inhibition by the antiviral drug Arbidol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114(2): 206-214.

Kallewaard, N. L., Corti, D., Collins, P. J., Neu, U., McAuliffe, J. M., Benjamin, E., Wachter-Rosati, L., Palmer-Hill, F. J., Yuan, A. Q., Walker, P. A., Vorlaender, M. K., Bianchi, S., Guarino, B., De Marco, A., Vanzetta, F., Agatic, G., Foglierini, M., Pinna, D., Fernandez-Rodriguez, B., Fruehwirth, A., Silacci, C., Ogrodowicz, R. W., Martin, S. R., Sallusto, F., Suzich, J. A., Lanzavecchia, A., Zhu, Q., Gamblin, S. J. and Skehel, J. J. (2016). Structure and Function Analysis of an Antibody Recognizing All Influenza A Subtypes. *Cell* 166(3): 596-608.

Karlas, A., Machuy, N., Shin, Y., Pleissner, K. P., Artarini, A., Heuer, D., Becker, D., Khalil, H., Ogilvie, L. A., Hess, S., Maurer, A. P., Muller, E., Wolff, T., Rudel, T. and Meyer, T. F. (2010). Genome-wide RNAi screen identifies human host factors crucial for influenza virus replication. *Nature* 463(7282): 818-822.

- Karlsson, R., Fagerstam, L., Nilshans, H. and Persson, B. (1993). Analysis of active antibody concentration. Separation of affinity and concentration parameters. *J Immunol Methods* 166(1): 75-84.
- Klimov, A., Balish, A., Veguilla, V., Sun, H., Schiffer, J., Lu, X., Katz, J. M. and Hancock, K. (2012). Influenza virus titration, antigenic characterization, and serological methods for antibody detection. *Methods Mol Biol* 865: 25-51.
- König, R., Stertz, S., Zhou, Y., Inoue, A., Hoffmann, H. H., Bhattacharyya, S., Alamares, J. G., Tscherne, D. M., Ortigoza, M. B., Liang, Y., Gao, Q., Andrews, S. E., Bandyopadhyay, S., De Jesus, P., Tu, B. P., Pache, L., Shih, C., Orth, A., Bonamy, G., Miraglia, L., Ideker, T., Garcia-Sastre, A., Young, J. A., Palese, P., Shaw, M. L. and Chanda, S. K. (2010). Human host factors required for influenza virus replication. *Nature* 463(7282): 813-817.
- Krishnamurthy, V. M., Estroff, L. A. and Whitesides, G. M. (2006). Fragment-based approaches in drug discovery. Multivalency in ligand design. Janke, W. and Erlanson, D. A. Weinheim, Germany, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co: S. 11-54.
- Kuiken, T., Riteau, B., Fouchier, R. A. and Rimmelzwaan, G. F. (2012). Pathogenesis of influenza virus infections: the good, the bad and the ugly. *Curr Opin Virol* 2(3): 276-286.
- Kuo, S. M., Chen, C. J., Chang, S. C., Liu, T. J., Chen, Y. H., Huang, S. Y. and Shih, S. R. (2017). Inhibition of Avian Influenza A Virus Replication in Human Cells by Host Restriction Factor TUFM Is Correlated with Autophagy. *MBio* 8(3).
- Kwon, S. J., Na, D. H., Kwak, J. H., Douaisi, M., Zhang, F., Park, E. J., Park, J. H., Youn, H., Song, C. S., Kane, R. S., Dordick, J. S., Lee, K. B. and Linhardt, R. J. (2016). Nanostructured glycan architecture is important in the inhibition of influenza A virus infection. *Nat Nanotechnol* DOI: 10.1038/NNANO.2016.181.
- Lakadamyali, M., Rust, M. J. and Zhuang, X. (2004). Endocytosis of influenza viruses. *Microbes Infect* 6(10): 929-936.
- Lauster, D., Glanz, M., Bardua, M., Ludwig, K., Hellmund, M., Hoffmann, U., Hamann, A., Bottcher, C., Haag, R., Hackenberger, C. P. R. and Herrmann, A. (2017). Multivalent Peptide-Nanoparticle Conjugates for Influenza-Virus Inhibition. *Angew Chem Int Ed Engl* 56(21): 5931-5936.
- Lauster, D., Pawolski, D., Storm, J., Ludwig, K., Volkmer, R., Memczak, H., Herrmann, A. and Bhatia, S. (2015). Potential of acylated peptides to target the influenza A virus. *Beilstein J Org Chem* 11: 589-595.
- Lee, P. M., Cherry, R. J. and Bachi, T. (1983). Correlation of rotational mobility and flexibility of Sendai virus spike glycoproteins with fusion activity. *Virology* 128(1): 65-76.
- Li, Q., Zhao, Z., Zhou, D., Chen, Y., Hong, W., Cao, L., Yang, J., Zhang, Y., Shi, W., Cao, Z., Wu, Y., Yan, H. and Li, W. (2011). Virucidal activity of a scorpion venom peptide variant mucroporin-M1 against measles, SARS-CoV and influenza H5N1 viruses. *Peptides* 32(7): 1518-1525.
- Li, S., Sieben, C., Ludwig, K., Hofer, C. T., Chiantia, S., Herrmann, A., Eghiaian, F. and Schaap, I. A. (2014). pH-Controlled two-step uncoating of influenza virus. *Biophys J* 106(7): 1447-1456.
- Lin, Y. P., Gregory, V., Collins, P., Kloess, J., Wharton, S., Cattle, N., Lackenby, A., Daniels, R. and Hay, A. (2010). Neuraminidase receptor binding variants of human influenza A(H3N2) viruses resulting from substitution of aspartic acid 151 in the catalytic site: a role in virus attachment? *J Virol* 84(13): 6769-6781.
- Liu, Q., Zhou, Y. H. and Yang, Z. Q. (2016). The cytokine storm of severe influenza and development of immunomodulatory therapy. *Cell Mol Immunol* 13(1): 3-10.

- Lopez-Martinez, R., Ramirez-Salinas, G. L., Correa-Basurto, J. and Barron, B. L. (2013). Inhibition of influenza A virus infection in vitro by peptides designed in silico. *PLoS One* 8(10): e76876.
- Ludlow, M., Kortekaas, J., Herden, C., Hoffmann, B., Tappe, D., Trebst, C., Griffin, D. E., Brindle, H. E., Solomon, T., Brown, A. S., van Riel, D., Wolthers, K. C., Pajkrt, D., Wohlsein, P., Martina, B. E. E., Baumgartner, W., Verjans, G. M. and Osterhaus, A. (2016). Neurotropic virus infections as the cause of immediate and delayed neuropathology. *Acta Neuropathol* 131(2): 159-184.
- Ludwig, C. (1856). Diffusion zwischen ungleich erwärmten Orten gleich zusammengesetzter Lösungen. *Sitzungsber Akad Wiss Wien Math-Naturwiss Kl.* 20: 539.
- Mammen, M., Choi, S. K. and Whitesides, G. M. (1998). Polyvalent interactions in biological systems: implications for design and use of multivalent ligands and inhibitors. *Angew Chem Int Ed* 37(20): 2775-2794.
- Mammen, M., Dahmann, G. and Whitesides, G. M. (1995). Effective inhibitors of hemagglutination by influenza virus synthesized from polymers having active ester groups. Insight into mechanism of inhibition. *J Med Chem* 38: 4179-4190.
- Matrosovich, M., Tuzikov, A., Bovin, N., Gambaryan, A., Klimov, A., Castrucci, M. R., Donatelli, I. and Kawaoka, Y. (2000). Early alterations of the receptor-binding properties of H1, H2, and H3 avian influenza virus hemagglutinins after their introduction into mammals. *J Virol* 74(18): 8502-8512.
- Matrosovich, M. N., Matrosovich, T. Y., Gray, T., Roberts, N. A. and Klenk, H. D. (2004). Neuraminidase is important for the initiation of influenza virus infection in human airway epithelium. *J Virol* 78(22): 12665-12667.
- Matsubara, T., Onishi, A., Saito, T., Shimada, A., Inoue, H., Taki, T., Nagata, K., Okahata, Y. and Sato, T. (2010). Sialic acid-mimic peptides as hemagglutinin inhibitors for anti-influenza therapy. *J Med Chem* 53(11): 4441-4449.
- Matsubara, T., Sumi, M., Kubota, H., Taki, T., Okahata, Y. and Sato, T. (2009). Inhibition of influenza virus infections by sialylgalactose-binding peptides selected from a phage library. *J Med Chem* 52(14): 4247-4256.
- Mehle, A. (2014). Unusual influenza A viruses in bats. *Viruses* 6(9): 3438-3449.
- Memczak, H., Lauster, D., Kar, P., Di Lella, S., Volkmer, R., Knecht, V., Herrmann, A., Ehrentreich-Forster, E., Bier, F. F. and Stocklein, W. F. (2016). Anti-Hemagglutinin Antibody Derived Lead Peptides for Inhibitors of Influenza Virus Binding. *PLoS One* 11(7): e0159074.
- Mogling, R., Richard, M. J., Vliet, S. V., Beek, R. V., Schrauwen, E. J. A., Spronken, M. I., Rimmelzwaan, G. F. and Fouchier, R. A. M. (2017). Neuraminidase-mediated haemagglutination of recent human influenza A(H3N2) viruses is determined by arginine 150 flanking the neuraminidase catalytic site. *J Gen Virol* 98(6): 1274-1281.
- Morton, T. A., Myszka, D. G. and Chaiken, I. M. (1995). Interpreting complex binding kinetics from optical biosensors: a comparison of analysis by linearization, the integrated rate equation, and numerical integration. *Anal Biochem* 227(1): 176-185.
- Moser, M. R., Bender, T. R., Margolis, H. S., Noble, G. R., Kendal, A. P. and Ritter, D. G. (1979). An outbreak of influenza aboard a commercial airliner. *Am J Epidemiol* 110(1): 1-6.
- Munoz, E. M., Correa, J., Riguera, R. and Fernandez-Megia, E. (2013). Real-time evaluation of binding mechanisms in multivalent interactions: a surface plasmon resonance kinetic approach. *J Am Chem Soc* 135(16): 5966-5969.
- Neiswinger, J., Uzoma, I., Cox, E., Rho, H., Song, G., Paul, C., Jeong, J. S., Lu, K. Y., Chen, C. S. and Zhu, H. (2016). Protein Microarrays: Flexible Tools for Scientific Innovation. *Cold Spring Harb Protoc* 2016(10): pdb top081471.

- Nicholls, J. M., Bourne, A. J., Chen, H., Guan, Y. and Peiris, J. S. (2007). Sialic acid receptor detection in the human respiratory tract: evidence for widespread distribution of potential binding sites for human and avian influenza viruses. *Respir Res* 8: 73.
- Nicholls, J. M., Moss, R. B. and Haslam, S. M. (2013). The use of sialidase therapy for respiratory viral infections. *Antiviral Res* 98(3): 401-409.
- Nobusawa, E., Aoyama, T., Kato, H., Suzuki, Y., Tateno, Y. and Nakajima, K. (1991). Comparison of complete amino acid sequences and receptor-binding properties among 13 serotypes of hemagglutinins of influenza A viruses. *Virology* 182(2): 475-485.
- Papp, I., Sieben, C., Sisson, A. L., Kostka, J., Böttcher, C., Ludwig, K., Herrmann, A. and Haag, R. (2011). Inhibition of influenza virus activity by multivalent glycoarchitectures with matched sizes. *Chembiochem* 12(6): 887-895.
- Park, J. K. and Taubenberger, J. K. (2016). Universal Influenza Vaccines: To Dream the Possible Dream? *ACS Infect Dis* 2(1): 5-7.
- Pekosz, A., Newby, C., Bose, P. S. and Lutz, A. (2009). Sialic acid recognition is a key determinant of influenza A virus tropism in murine trachea epithelial cell cultures. *Virology* 386(1): 61-67.
- Peng, W., de Vries, R. P., Grant, O. C., Thompson, A. J., McBride, R., Tsogtbaatar, B., Lee, P. S., Razi, N., Wilson, I. A., Woods, R. J. and Paulson, J. C. (2017). Recent H3N2 Viruses Have Evolved Specificity for Extended, Branched Human-type Receptors, Conferring Potential for Increased Avidity. *Cell Host Microbe* 21(1): 23-34.
- Pielak, R. M. and Chou, J. J. (2011). Influenza M2 proton channels. *Biochim Biophys Acta* 1808(2): 522-529.
- Popova, V. V., Kurshakova, M. M. and Kopytova, D. V. (2015). Methods to study the RNA-protein interactions. *Mol Biol* 49(3): 472-481.
- Pritchett, T. J., Brossmer, R., Rose, U. and Paulson, J. C. (1987). Recognition of monovalent sialosides by influenza virus H3 hemagglutinin. *Virology* 160(2): 502-506.
- Rajik, M., Omar, A. R., Ideris, A., Hassan, S. S. and Yusoff, K. (2009). A novel peptide inhibits the influenza virus replication by preventing the viral attachment to the host cells. *Int J Biol Sci* 5(6): 543-548.
- Reddy, T., Shorthouse, D., Parton, D. L., Jefferys, E., Fowler, P. W., Chavent, M., Baaden, M. and Sansom, M. S. (2015). Nothing to sneeze at: a dynamic and integrative computational model of an influenza A virion. *Structure* 23(3): 584-597.
- Ribeiro-Viana, R., Sanchez-Navarro, M., Luczkowiak, J., Koeppe, J. R., Delgado, R., Rojo, J. and Davis, B. G. (2012). Virus-like glycodendrinanoparticles displaying quasi-equivalent nested polyvalency upon glycoprotein platforms potentially block viral infection. *Nat Commun* 3: 1303.
- Roberts, P. C., Garten, W. and Klenk, H. D. (1993). Role of conserved glycosylation sites in maturation and transport of influenza A virus hemagglutinin. *J Virol* 67(6): 3048-3060.
- Rogers, G. N. and Paulson, J. C. (1983). Receptor determinants of human and animal influenza virus isolates: differences in receptor specificity of the H3 hemagglutinin based on species of origin. *Virology* 127(2): 361-373.
- Rossman, J. S. and Lamb, R. A. (2011). Influenza virus assembly and budding. *Virology* 411(2): 229-236.
- Rynda-Apple, A., Robinson, K. M. and Alcorn, J. F. (2015). Influenza and Bacterial Superinfection: Illuminating the Immunologic Mechanisms of Disease. *Infect Immun* 83(10): 3764-3770.
- Sakai, T., Nishimura, S. I., Naito, T. and Saito, M. (2017). Influenza A virus hemagglutinin and neuraminidase act as novel motile machinery. *Sci Rep* 7: 45043.

- Sametband, M., Kalt, I., Gedanken, A. and Sarid, R. (2014). Herpes simplex virus type-1 attachment inhibition by functionalized graphene oxide. *ACS Appl Mater Interfaces* 6(2): 1228-1235.
- Sano, K., Aina, A., Suzuki, T. and Hasegawa, H. (2017). The road to a more effective influenza vaccine: Up to date studies and future prospects. *Vaccine* 35(40): 5388-5395.
- Saunders-Hastings, P. R. and Krewski, D. (2016). Reviewing the History of Pandemic Influenza: Understanding Patterns of Emergence and Transmission. *Pathogens* 5(4).
- Sauter, N. K., Bednarski, M. D., Wurzburg, B. A., Hamon, J. E., Whitesides, G. M., Skehel, J. J. and Wiley, D. C. (1989). Hemagglutinins from two influenza virus variants bind to sialic acid derivatives with millimolar dissociation constants: a 500-MHz proton nuclear magnetic resonance study. *Biochemistry* 28(21): 8388-8396.
- Sauter, N. K., Glick, G. D., Crowther, R. L., Park, S.-J., Eisen, M. B., Skehel, J. J., Knowles, J. R. and Wiley, D. C. (1992). Crystallographic detection of a second ligand binding site in influenza virus hemagglutinin. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 324-328.
- Scheibe, C., Wedepohl, S., Riese, S. B., Dornedde, J. and Seitz, O. (2013). Carbohydrate-PNA and aptamer-PNA conjugates for the spatial screening of lectins and lectin assemblies. *Chembiochem* 14(2): 236-250.
- Schwarz, R. T., Rohrschneider, J. M. and Schmidt, M. F. (1976). Suppression of glycoprotein formation of Semliki Forest, influenza, and avian sarcoma virus by tunicamycin. *J Virol* 19(3): 782-791.
- Seidel, S. A., Dijkman, P. M., Lea, W. A., van den Bogaart, G., Jerabek-Willemsen, M., Lazic, A., Joseph, J. S., Srinivasan, P., Baaske, P., Simeonov, A., Katritch, I., Melo, F. A., Ladbury, J. E., Schreiber, G., Watts, A., Braun, D. and Duhr, S. (2013). Microscale thermophoresis quantifies biomolecular interactions under previously challenging conditions. *Methods* 59(3): 301-315.
- Shinya, K., Ebina, M., Yamada, S., Ono, M., Kasai, N. and Kawaoka, Y. (2006). Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. *Nature* 440(7083): 435-436.
- Shriver, Z., Trevejo, J. M. and Sasisekharan, R. (2015). Antibody-Based Strategies to Prevent and Treat Influenza. *Front Immunol* 6: 315.
- Shtyrya, Y. A., Mochalova, L. V. and Bovin, N. V. (2009). Influenza virus neuraminidase: structure and function. *Acta Naturae* 1(2): 26-32.
- Sieben, C., Kappel, C., Zhu, R., Wozniak, A., Rankl, C., Hinterdorfer, P., Grubmüller, H. and Herrmann, A. (2012). Influenza virus binds its host cell using multiple dynamic interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(34): 13626-13631.
- Skehel, J. J. and Wiley, D. C. (2000). Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem* 69: 531-569.
- Smith, G. P. and Petrenko, V. A. (1997). Phage Display. *Chem Rev* 97(2): 391-410.
- Strauch, E. M., Bernard, S. M., La, D., Bohn, A. J., Lee, P. S., Anderson, C. E., Nieusma, T., Holstein, C. A., Garcia, N. K., Hooper, K. A., Ravichandran, R., Nelson, J. W., Sheffler, W., Bloom, J. D., Lee, K. K., Ward, A. B., Yager, P., Fuller, D. H., Wilson, I. A. and Baker, D. (2017). Computational design of trimeric influenza-neutralizing proteins targeting the hemagglutinin receptor binding site. *Nat Biotechnol* 35(7): 667-671.
- Su, B., Wurtzer, S., Rameix-Welti, M. A., Dwyer, D., van der Werf, S., Naffakh, N., Clavel, F. and Labrosse, B. (2009). Enhancement of the influenza A hemagglutinin (HA)-mediated cell-cell fusion and virus entry by the viral neuraminidase (NA). *PLoS One* 4(12): e8495.
- Su, S., Fu, X., Li, G., Kerlin, F. and Veit, M. (2017). Novel Influenza D Virus: Epidemiology, pathology, evolution and biological characteristics. *Virulence* 0(0): 12.

- Sung, J. C., Van Wynsberghe, A. W., Amaro, R. E., Li, W. W. and McCammon, J. A. (2010). Role of secondary sialic acid binding sites in influenza N1 neuraminidase. *J Am Chem Soc* 132(9): 2883-2885.
- Swatek, K. N., Lee, C. B. and Thelen, J. J. (2014). Purification of protein complexes and characterization of protein-protein interactions. *Methods Mol Biol* 1062: 609-628.
- Takemoto, D. K., Skehel, J. J. and Wiley, D. C. (1996). A surface plasmon resonance assay for the binding of influenza virus hemagglutinin to its sialic acid receptor. *Virology* 217(2): 452-458.
- Tassa, C., Duffner, J. L., Lewis, T. A., Weissleder, R., Schreiber, S. L., Koehler, A. N. and Shaw, S. Y. (2010). Binding affinity and kinetic analysis of targeted small molecule-modified nanoparticles. *Bioconjug Chem* 21(1): 14-19.
- Tate, M. D., Job, E. R., Deng, Y. M., Gunalan, V., Maurer-Stroh, S. and Reading, P. C. (2014). Playing hide and seek: how glycosylation of the influenza virus hemagglutinin can modulate the immune response to infection. *Viruses* 6(3): 1294-1316.
- Taubenberger, J. K. and Morens, D. M. (2006). 1918 Influenza: the mother of all pandemics. *Emerg Infect Dis* 12(1): 15-22.
- Taubenberger, J. K. and Morens, D. M. (2008). The pathology of influenza virus infections. *Annu Rev Pathol* 3: 499-522.
- Teraoka, I. (2002). *Polymer solutions an introduction to physical properties*. New York, Wiley.
- Toogood, P. L., Galliker, P. K., Glick, G. D. and Knowles, J. R. (1991). Monovalent sialosides that bind tightly to influenza A virus. *J Med Chem* 34(10): 3138-3140.
- Toshihiko, S. (2012). Chemical Insight Into the Influenza A Virus Hemagglutinin Binding to the Sialoside Revealed by the Fragment Molecular Orbital Method. *Open Glycoscience*(5): 26-30.
- Van de Wakker, S. I., Fischer, M. J. E. and Oosting, R. S. (2017). New drug-strategies to tackle viral-host interactions for the treatment of influenza virus infections. *Eur J Pharmacol* 809: 178-190.
- Van Regenmortel, M. H. (2001). Antigenicity and immunogenicity of synthetic peptides. *Biologicals* 29(3-4): 209-213.
- Varki, A. (2008). Sialic acids in human health and disease. *Trends Mol Med* 14(8): 351-360.
- Veit, M., Serebryakova, M. V. and Kordyukova, L. V. (2013). Palmitoylation of influenza virus proteins. *Biochem Soc Trans* 41(1): 50-55.
- Vonnemann, J., Liese, S., Kuehne, C., Ludwig, K., Dervede, J., Bottcher, C., Netz, R. R. and Haag, R. (2015). Size dependence of steric shielding and multivalency effects for globular binding inhibitors. *J Am Chem Soc* 137(7): 2572-2579.
- Wagner, R., Matrosovich, M. and Klenk, H. D. (2002). Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections. *Rev Med Virol* 12(3): 159-166.
- Wagner, R., Wolff, T., Herwig, A., Pleschka, S. and Klenk, H. D. (2000). Interdependence of hemagglutinin glycosylation and neuraminidase as regulators of influenza virus growth: a study by reverse genetics. *J Virol* 74(14): 6316-6323.
- Waldmann, M., Jirmann, R., Hoelscher, K., Wienke, M., Niemeyer, F. C., Rehders, D. and Meyer, B. (2014). A nanomolar multivalent ligand as entry inhibitor of the hemagglutinin of avian influenza. *J Am Chem Soc* 136(2): 783-788.
- Weber, M., Bujotzek, A. and Haag, R. (2012). Quantifying the rebinding effect in multivalent chemical ligand-receptor systems. *J Chem Phys* 137(5): 054111.

- Webster, R. G., Bean, W. J., Gorman, O. T., Chambers, T. M. and Kawaoka, Y. (1992). Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev* 56(1): 152-179.
- Weinheimer, V. K., Becher, A., Tonnies, M., Holland, G., Knepper, J., Bauer, T. T., Schneider, P., Neudecker, J., Ruckert, J. C., Szymanski, K., Temmesfeld-Wollbrueck, B., Gruber, A. D., Bannert, N., Suttorp, N., Hippenstiel, S., Wolff, T. and Hocke, A. C. (2012). Influenza A viruses target type II pneumocytes in the human lung. *J Infect Dis* 206(11): 1685-1694.
- Whitesides, G. M. and Krishnamurthy, V. M. (2005). Designing ligands to bind proteins. *Quarterly Reviews of Biophysics* 38(4): 385-395.
- Wiechelmann, K. J., Braun, R. D. and Fitzpatrick, J. D. (1988). Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Analytical biochemistry* 175(1): 231-237.
- Wijaya, E., Lenaerts, C., Maricot, S., Hastanin, J., Habraken, S., Vilcot, J.-P., Boukherroub, R. and Szunerits, S. (2011). Surface plasmon resonance-based biosensors: From the development of different SPR structures to novel surface functionalization strategies. *Current Opinion in Solid State and Materials Science* 15(5): 208-224.
- Woo, H. J. and Roux, B. (2005). Calculation of absolute protein-ligand binding free energy from computer simulations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(19): 6825-6830.
- Wu, D., Li, G., Qin, C. and Ren, X. (2011). Phage displayed peptides to avian H5N1 virus distinguished the virus from other viruses. *PLoS One* 6(8): e23058.
- Wu, X., Wu, X., Sun, Q., Zhang, C., Yang, S., Li, L. and Jia, Z. (2017). Progress of small molecular inhibitors in the development of anti-influenza virus agents. *Theranostics* 7(4): 826-845.
- Xiong, X., Coombs, P. J., Martin, S. R., Liu, J., Xiao, H., McCauley, J. W., Locher, K., Walker, P. A., Collins, P. J., Kawaoka, Y., Skehel, J. J. and Gamblin, S. J. (2013). Receptor binding by a ferret-transmissible H5 avian influenza virus. *Nature* 497(7449): 392-396.
- Xu, R. and Wilson, I. A. (2011). Structural characterization of an early fusion intermediate of influenza virus hemagglutinin. *J Virol* 85(10): 5172-5182.
- Yang, J., Liu, S., Du, L. and Jiang, S. (2016). A new role of neuraminidase (NA) in the influenza virus life cycle: implication for developing NA inhibitors with novel mechanism of action. *Rev Med Virol* 26(4): 242-250.
- Yang, X., Steukers, L., Forier, K., Xiong, R., Braeckmans, K., Van Reeth, K. and Nauwynck, H. (2014). A beneficiary role for neuraminidase in influenza virus penetration through the respiratory mucus. *PLoS One* 9(10): e110026.
- Yoon, S. W., Webby, R. J. and Webster, R. G. (2014). Evolution and ecology of influenza A viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 385: 359-375.
- Zeng, H., Goldsmith, C. S., Maines, T. R., Belser, J. A., Gustin, K. M., Pekosz, A., Zaki, S. R., Katz, J. M. and Tumpey, T. M. (2013). Tropism and infectivity of influenza virus, including highly pathogenic avian H5N1 virus, in ferret tracheal differentiated primary epithelial cell cultures. *J Virol* 87(5): 2597-2607.
- Zhu, L., Li, Y., Li, S., Li, H., Qiu, Z., Lee, C., Lu, H., Lin, X., Zhao, R., Chen, L., Wu, J. Z., Tang, G. and Yang, W. (2011). Inhibition of influenza A virus (H1N1) fusion by benzenesulfonamide derivatives targeting viral hemagglutinin. *PLoS One* 6(12): e29120.
- Zhu, X., McBride, R., Nycholat, C. M., Yu, W., Paulson, J. C. and Wilson, I. A. (2012). Influenza virus neuraminidases with reduced enzymatic activity that avidly bind sialic Acid receptors. *J Virol* 86(24): 13371-13383.